

Am

**IMMUNOREACTIVE REAGENTS EMPLOYING DIHYDROFOLATE REDUCTASE****Publication number:** JP8507750T**Publication date:** 1996-08-20**Inventor:****Applicant:****Classification:**

**- International:** G01N33/53; A61K47/48; A61K49/00; A61K51/00;  
A61K51/10; C12N1/21; C12N9/06; G01N33/532;  
G01N33/535; G01N33/573; G01N33/574; C12R1/19;  
G01N33/53; A61K47/48; A61K49/00; A61K51/00;  
A61K51/02; C12N1/21; C12N9/06; G01N33/532;  
G01N33/535; G01N33/573; G01N33/574; (IPC1-7):  
C12N1/21; C12N9/06; A61K49/00; A61K51/00;  
G01N33/53; C12N1/21; C12R1/19

**- European:** A61K47/48T; A61K47/48T2C; A61K47/48T4F;  
A61K47/48T6; A61K51/10Z; G01N33/532; G01N33/535;  
G01N33/573; G01N33/574

**Application number:** JP19930514321T 19931206**Priority number(s):** WO1993US11842 19931206; US19920990423  
19921215**Also published as:**

WO9413327 (A1)



EP0675737 (A1)



EP0675737 (A0)

**Report a data error here**

Abstract not available for JP8507750T

Abstract of corresponding document: **WO9413327**

This invention describes a non-radioactive targeting immunoreagent comprised of the residue of a proteinaceous active site of a dihydrofolate reductase enzyme (DHFR), a linking group, and the residue of an immunoreactive material together with a radioactive delivery agent comprised of the residue of a ligand which has an affinity for non-covalent binding to said DHFR receptor moiety, a linking group, and the residue of a radioactive agent. This invention also describes a non-radioactive targeting immunoreagent comprised of the residue of a ligand which has an affinity for non-covalent binding to a DHFR proteinaceous active site receptor moiety, a linking group, and the residue of an immunoreactive material together with a radioactive delivery agent comprised of the residue of a DHFR proteinaceous active site receptor moiety, a linking group, and a radioactive agent. These compositions comprise useful systems for the production of an amplification of delivery of the radioactive agent to tumor sites in the therapy and diagnostic imaging of cancer.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide**BEST AVAILABLE COPY**

(19)日本国特許庁 (JP)

## (12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平8-507750

(43)公表日 平成8年(1996)8月20日

(51) Int.Cl. <sup>®</sup>	識別記号	序内整理番号	F I
A 61 K 49/00	A	7431-4C	
51/00			
G 01 N 33/53	Z	8310-2J	
# C 12 N 1/21		8828-4B	
		7431-4C	A 61 K 49/02
			C
	審査請求 未請求	予備審査請求 有	(全 81 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平6-514321  
 (26) (22)出願日 平成5年(1993)12月6日  
 (35)翻訳文提出日 平成7年(1995)6月13日  
 (36)国際出願番号 PCT/US93/11842  
 (37)国際公開番号 WO94/13327  
 (37)国際公開日 平成6年(1994)6月23日  
 (31)優先権主張番号 990,423  
 (32)優先日 1992年12月15日  
 (33)優先権主張国 米国(US)  
 (31)指定国 EP(AT, BE, CH, DE,  
 DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M  
 C, NL, PT, SE), AU, CA, JP, US

(71)出願人 ザ・ウエルカム・ファウンデーション・リ  
 ミテッド  
 イギリス国、エヌダブリュ1・2ビービ  
 ー、ロンドン、ユーストン・ロード 160,  
 ユニコーン・ハウス  
 (72)発明者 スノー、ロバート・エー  
 アメリカ合衆国、ペンシルバニア州  
 19380、ウエスト・チェスター、クレイテ  
 イン・レーン 118  
 (74)代理人 弁理士 鈴江 武彦 (外3名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ジヒドロフォレートレダクターゼを用いる免疫反応試薬

## (57)【要約】

この発明は、ジヒドロフォレートレダクターゼ酵素(DHFR)の蛋白様活性部位の残部、連結基、および免疫反応性物質の残部を含んでなる非放射性ターゲッティング免疫試薬を、DHFRレセプター分子に非共有的に結合するための親和性を有するリガンドの残部、連結基、および放射活性剤の残部を含んでなる放射性送達剤と共に記述する。この発明はまた、DHFR蛋白様活性部位レセプター分子に非共有的に結合するための親和性を有するリガンドの残部、連結基、および免疫反応性物質の残部を含んでなる非放射性ターゲッティング免疫試薬を、DHFR蛋白様活性部位レセプター分子の残部、連結基、および放射活性剤を含んでなる放射性送達剤と共に記述する。これらの組成物は、ガンの治療および診断造影において、腫瘍部位への放射活性剤の配達を増大させる有用なシステムを包含している。

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平8-5077750

(43)公表日 平成8年(1996)8月20日

(51)Int.Cl.*	類別記号	片内整理番号	P1
A 61 K 49/00	A 7431-4C		
51/00	Z 830-2J		
G 01 N 33/53	838-3-B		
¶ C 12 N 1/21	7431-1C	A 61 K 49/02	C
	審査請求 未請求	予備審査請求 有	(全 81 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平-514321	(71)出願人	ザ・ウエルカム・ファウンデーション・リミテッド
(66) (22)出願日	平成5年(1993)12月6日		イギリス屈、エヌタブリュ1・2ビーピー
(65) 館提出日	平成7年(1995)6月13日		、ロンドン、ユーストン・ロード 160、
(66) 国際出願番号	PCT/US93/11842		コニコーン・ハウス
(67) 国際公開番号	WO94/13327	(72)発明者	アーノ、ロバート・エーベリリカ官能屈、ベンシルバニアアベ
(67) 国際公開日	平成6年(1994)6月23日		(1996)、ウエスト・チェスター、クレイテ
(31)優先権主張番号	9 90, 423		イン・レーン 118
(32)優先権主張日	1992年12月15日	(74)代理人	弁理士 鈴江 武道 (外3名)
(33)優先権主張国	米国(US)		
(31)指定国	E P (AT), B E, C H, D E, D K, E S, F R, G B, G R, I E, I T, L U, M C, N L, P T, S E, A U, C A, J P, U S		

最終頁に続く

(54)【発明の名稱】シドロフォレートレダクターを用いる免疫反応試験

(57)【発明】  
 この発明は、ジドロフォレートレダクターを酵素 (D HFR) の蛋白機能性部位の残部、連結基、および免疫反応性の頭部を含んでなる非放射性ターゲッティング免疫試験を、D HFRレセプター分子に非共有的に結合するための頭部を含んでなる放射性送達剤と結合するための頭部を含んでなる放射性送達剤と共に記述する。この発明はまた、D HFR蛋白機能性部位レセプター分子に非共有的に結合するための頭部を有するリガンドの頭部、連結基、および免疫反応性生物質の頭部を含んでなる非放射性ターゲッティング免疫試験を、D HFR蛋白機能性部位レセプター分子の頭部、連結基、および放射活性送達剤を含んでなる放射性送達剤と共に記述する。これらの頭部は、ガンの治療および診断治療において、腫瘍部位への放射活性剤の配達を拡大させる有用なシステムを包含している。

[特許請求の範囲]

- 免疫反応性物質、1種以上のレセプター分子もしくはレセプター分子に非共有的に結合するための親和性を有するリガンドの残部、および1種以上の連結基を含む非放射性ターゲッティング免疫試験。
- レセプター分子もしくはレセプター分子に非共有的に結合するための親和性を有するリガンドの残部、1種以上のキレート剤、1種以上の連結基および1種以上の放射性核種を含む放射活性ターゲッティング免疫試験。

- 下記構造で表わされる分子を含むターゲッティング免疫試験。

 $Z - (L_1 - X)^n$ 

ここで：

Zは、免疫反応性蛋白質の残部を含み；

L<sub>1</sub>は、間隔基を含んでいてもよい、化学結合または連結基；  
 Xは、レセプター分子またはレセプター分子に非共有的に結合するための親和性を有するリガンドの残部；およびnは、0より大きい整数。

- 下記構造で表わされる分子を含む放射活性ターゲッティング試験。

 $D - (L_1 - Q - M)^n$ 

ここで：

Dは、レセプター分子またはレセプター分子に非共有的に結合するための親和性を有するリガンドの残部；  
 Mは、放射性核種；およびnは、0よりも大きい整数。

- Zが抗体または抗体断片の残部である請求の範囲第3項記載の試験。
- 抗体がING-1; B72.3; 9.2.27; D612; UJ13A; NRLU-10; 7 E11C5; C49; TNT; PR1A3; B174; B43; および抗HLB抗体から選択される請求の範囲第5項記載の試験。

7. Xがジヒドロフォレートレダクターゼの残部が、プラスミドpCV29で形質転換された大腸菌CV634株に由来する請求の範囲第3項記載の試薬。

8. ジヒドロフォレートレダクターゼの残部が、アミノ基およびスルフィドリ基からなる群より選択される請求の範囲第7項記載の試薬。

9. Xがトリメトブリム類似体の残部およびメトレキセート類似体の残部からなる群より選択される請求の範囲第3項記載の試薬。

10. L<sub>1</sub>がヘテロ二官能性架橋剤の残部を含む請求の範囲第3項記載の試薬。

11. ヘテロ二官能性架橋剤が、スルホスクシニミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート、スルホスクシニミジル4-(ヨードアセチル)アミノベンゾエート、スルホスクシニミジル4-(p-マレイミドフェニル)ブチレート、2-イミノチオラン、およびN-スクシニミジル5-アセチルチオアセテートからなる群より選択される請求の範囲第10項記載の試薬。

12. L<sub>1</sub>が、反応性官能基を有する変性レセプター分子の残部を含む請求の範囲第3項記載の試薬。

13. 反応性官能基が、アミノ基およびスルフィドリ基からなる群より選択される請求の範囲第12項記載の試薬。

14. Dが、トリメトブリム類似体の残部およびメトレキセート類似体の残部からなる群より選択される請求の範囲第4項記載の試薬。

15. Dがジヒドロフォレートレダクターゼの残部である請求の範囲第4項記載の試薬。

16. ジヒドロフォレートレダクターゼの残部が、プラスミドpCV29で形質転換された大腸菌CV634株に由来する請求の範囲第15項記載の試薬。

17. L<sub>1</sub>がヘテロ二官能性架橋剤の残部を含む請求の範囲第4項記載の試薬。

18. ヘテロ二官能性架橋剤が、スルホスクシニミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート、スルホスクシニミジル4-(ヨードアセチル)アミノベンゾエート、スルホスクシニミジル4-(p-マレイミドフェニル)ブチレート、2-イミノチオラン、およびN-スクシニミジル5-アセチルチオアセテートからなる群より選択される請求の範囲第17項記載の試薬。

19. L<sub>1</sub>が、反応性官能基を有する変性リガンド分子の残群より選択される請求の範囲第4項記載の試薬。

の試薬

部である請求の範囲第4項記載の試薬。

20. 反応性官能基が、アミノ基およびスルフィドリ基からなる群より選択される請求の範囲第19項記載の試薬。

21. Qがボリカルボン酸基を含む請求の範囲第4項記載の試薬。

22. Qが、B4A、P4A、TMT、DCDTPA、PhemT、マクロPhemT、およびマクロTMTからなる群より選択される請求の範囲第4項記載の試薬。

23. Mが金属の放射性同位体である請求の範囲第4項記載の試薬。

24. 放射性同位体が、<sup>232</sup>Pb、<sup>211</sup>Bi、<sup>90</sup>Y、<sup>177</sup>Lu、<sup>166</sup>Re、<sup>166</sup>Re、<sup>67</sup>Cu、<sup>67</sup>Cu、<sup>99</sup>Tc、<sup>111</sup>In、および<sup>99</sup>Yから選択される請求の範囲第23項記載の試薬。

25. 下記構造:



ここで:

Zは、免疫反応性蛋白質の残部を含む;

L<sub>1</sub>は、間隔基を含んでいてもよい、化学結合または連結基;

Xは、レセプター分子またはレセプター分子に非共有的に結合するための親和性を有するリガンドの残部;およびnは、0より大きい整数。

の化合物を作製する方法であつて、

(i) XをL<sub>1</sub>の残部の前駆体と、L<sub>1</sub>-Xの残部の前駆体

である共有結合複合体を形成するに十分な条件下で、かつ十分な時間反応させ;および

(ii) 工程(i)において生成されたL<sub>1</sub>-Xの残部の前駆体とZを、共有結合複合体Z-(L<sub>1</sub>-X)を形成するに十分な条件下で、かつ十分な時間反応させる、

ことを包含する方法。

26. 工程 (ii) が、

(ii a)  $Z$  を  $L_1$  の残部の前駆体と、 $Z - (L_1)$  の残部の前駆体である共有結合複合体を形成するに十分な条件下で、かつ十分な時間反応させ；および

(ii b) 工程 (ii a) において生成された  $Z - (L_1)$  の残部の前駆体と、 $Z$  の残部の前駆体と、共有結合複合体  $D - (L_1 - Q)$  を形成するに十分な条件下で、かつ十分な時間反応させ、

ことを包含する請求の範囲第25項記載の方法。

29.  $Z$  が抗体または抗体断片である請求の範囲第25項記載の方法。

30. 抗体が ING-1 ; B72.3 ; 9.2.27 ; D612 ; UJ13A ; NRU-10 ; 7E

ILC5 ; C49 ; TNT ; PR1A3 ; B174 ; B43 ; および抗HLB抗体から選択される請求の範囲第25項記載の方法。

27. 下記構造



ここで：

$D$  は、レセプター分子またはレセプター分子に非共有的に結合するための親和性を有するリガンドの残部；

$L_1$  は、間隔基を含んでいてもよい、化学結合または連結基；

$Q$  は、キレート基の残部；

$M$  は、放射性核種；および

$m$  は、0よりも大きい整数、

の化合物を作製する方法であつて、

(i)  $Q$  を  $L_1$  の残部の前駆体と、 $L_1 - Q$  の残部の前駆体である共有結合複合体を形成するに十分な条件下で、かつ十分な時間反応させ、

(ii) 工程 (i) において生成された  $L_1 - Q$  の残部の前駆体と  $D$  とを、共有結合複合体  $D - (L_1 - Q)$  を形成するに十分な条件下で、かつ十分な時間反応させ、および

(iii) 該共有結合複合体  $D - (L_1 - Q)$  を  $M$  と、複合体  $D - (L_1 - Q - M)$  を形成するに十分な条件下で、かつ十分な時間反応させることを包含する方法。

28. 工程 (ii) が、

(ii a)  $D$  を  $L_1$  の残部の前駆体と、 $D - (L_1)$  の残部の前駆体である共有結合

合複合体を形成するに十分な条件下で、かつ十分な時間反応させ；および

(ii b) 工程 (ii a) において生成される  $D - (L_1)$  の残部の前駆体を  $L_1 - Q$  の残部の前駆体と、共有結合複合体  $D - (L_1 - Q)$  を形成するに十分な条件下で、かつ十分な時間反応させ、

ことを包含する請求の範囲第25項記載の方法。

29.  $Z$  が抗体または抗体断片である請求の範囲第25項記載の方法。

30. 抗体が ING-1 ; B72.3 ; 9.2.27 ; D612 ; UJ13A ; NRU-10 ; 7E

ILC5 ; C49 ; TNT ; PR1A3 ; B174 ; B43 ; および抗HLB抗体から選択される請求の範囲第25項記載の方法。

31. 要求の範囲第29項記載の抗体。

31.  $X$  がトリメトブリム類似体の残部およびメトトレキセート類似体の残部からなる群より選択される請求の範囲第25項記載の試薬。

32.  $L_1$  がヘテロ二官能性架橋剤の残部を含む請求の範囲第25項記載の試薬。

33. ヘテロ二官能性架橋剤が、スルホスクシニミジル4- (N-マレイミドメチル) シクロヘキサン-1-カルボキシレート、スルホスクシニミジル (4-ヨードアセチル) アミノベンゾエート、スルホスクシニミジル 4-(P-マレイミドフェニル) アチレート、2-イミノチオラン、およびトススクシニミジル S-アセチルチオアセテートからなる群より選択される請求の範囲第32項記載の試薬。

34.  $L_1$  が、反応性官能基を有する変性スクレオチド分子の残部を含む請求の範囲第25項記載の試薬。

35. 反応性官能基が、アミン基およびスルフィドリ基からなる群より選択される請求の範囲第34項記載の試薬。

36.  $X$  がシビドロフォレートダクターゼの残部である請求の範囲第25項記載の試薬。

37. ジヒドロフォレートダクターゼの残部が、プラスミド pCV29で形質転換された大腸菌 C V634株に由来する請求の範囲第36項記載の試薬。

38.  $D$  がトリメトブリム類似体の残部およびメトトレキセート類似体の残部からなる群より選択される請求の範囲第28項記載の試薬。

39. Dがジヒドロフォレートレダクターゼの残部である請求の範囲第28項記載の方法。

40. ジヒドロフォレートレダクターゼの残部が、プラスミドpCV29で形質転換された大腸菌CV634株に由来する請求の範囲第35項記載の試薬。

41. L<sub>1</sub>がヘテロ二官能性架橋剤の残部を含む請求の範囲第28項記載の試薬。

42. ヘテロ二官能性架橋剤が、スルホスキンミジル4(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート、スルホスキンミジル(4-ヨードアセチル)アミノベンゾエート、スルホスキンミジル4(p-マレイミドフェニル)チレート、2-ミノノチオラン、およびN-スキンミジルS-アセチルチオアセテートからなる群より選択される請求の範囲第41項記載の試薬。

43. L<sub>1</sub>が、反応性官能基を有するリガンド分子の残部を含む請求の範囲第41項記載の試薬。

44. 反応性官能基が、アミン基、カルボキシレート基、ヒドロキシル基およびスルフィドリル基から選択される請求の範囲第43項記載の試薬。

45. Qがポリカルボン酸基を含む請求の範囲第28項記載の方法。

46. Qが、B<sub>4</sub>A、P<sub>4</sub>A、TMT、DCDTPA、PhemT、マクロPhemT、およびマクロTMTからなる群より選択される請求の範囲第28項記載の試薬。

47. Mが金属の放射性同位体である請求の範囲第28項記載の試薬。

48. 放射性同位体が、<sup>212</sup>Pb、<sup>212</sup>Bi、<sup>90</sup>Y、<sup>177</sup>Lu、<sup>166</sup>Re、<sup>166</sup>Rh、<sup>64</sup>Cu、<sup>67</sup>Cu、<sup>99</sup>Tc、<sup>111</sup>In、および<sup>99</sup>Yから選択される請求の範囲第47項記載の試薬。

49. 薬学的に許容し得る担体中に溶解もしくは分散されている請求の範囲第3項に記載される化合物を含む医薬組成物。

50. 薬学的に許容し得る媒体中に溶解もしくは分散されている請求の範囲第4項に記載される化合物を含む医薬組成物。

51. 哺乳動物における腫瘍の治療方法であって、薬学的に許容し得る媒体中に含まれる請求の範囲第3項に記載される非放射性ターゲッティング試薬が散乳動物に投与し、該非放射性ターゲッティング試薬が該部位に蓄積するに十分な時間待ち、続いて、薬学的に許容し得る媒体中に含まれる請求の範囲第4項に記載される散射性ターゲッティング試薬の有効投与量を該哺乳動物に投与し、該放射性ターゲッティング試薬が標的部位に蓄積するに十分な時間待ち、ここで該標的部位は該哺乳動物における該腫瘍に蓄積される該非放射性ターゲッティング免疫試薬である方法。

52. 哺乳動物における診断造影の方法であって、薬学的に許容し得る媒体中に含まれる請求の範囲第3項に記載される非放射性ターゲッティング試薬の造影上有効な投与量を該哺乳動物に投与し、該非放射性ターゲッティング免疫試薬が該哺乳動物における造影部位に蓄積するに十分な時間待ち、

53. Xがレセプター分子の残部であり、かつZおよびXが融合蛋白質を含む請求の範囲第3項記載の試薬。

54. レセプター分子がジヒドロフォレートレダクターゼである請求の範囲第53項記載の試薬。

## 【発明の詳細な説明】

ジビドロフォレートレダクターゼを用いる免疫反応試薬

## 発明の分野

この発明は、一次非放射性ターゲッティング免疫試薬および二次放射性送達系を含む腫瘍指向性連続送達系 [tumortargeted sequential delivery system] による、ガンの治療処置および診断造影に関する。

## 発明の背景

診断用の造影用および標的が設定された治療の適用に用いられる、現在利用可能な種々の放射標識免疫反応性蛋白質には、以下の不利益がある。

## 1) 毒性；

2) 急速な異化または代謝による試薬の破壊または排泄；

3) 結果として低い信号対雑音比を招く、放射能放出の不適切なエネルギー；

4) 複合体調製物における、放射活性成分と蛋白質との非能率的な共有結合；

5) 現在利用可能な放射性核種含有免疫反応性蛋白質の長い血漿半減期は、正常組織を放射線の損傷作用に晒す期間を引き伸ばす結果となる。これは、体内の他の点では正常な、あるいは疾患を持たない組織、特に放射線損傷に最も敏感な組織および細胞、例えば骨髄および胃腸管の幹細胞に許容し得ない毒性効果を生じることがある；

6) 生体からの放射性核種の過剰クリアランス；

7) 放射性核種またはキレートされた放射性核種を取り込む

部位の数が増加することにより、放射性核種含有免疫反応性蛋白質がその標的に結合する能力が減少する；

8) 免疫反応性蛋白質に結合することができるキレート剤の数が、免疫反応性認識から除去される部位もしくは蛋白質の結合部位への化学結合を制限する必要性により限定される；

9) 免疫反応性蛋白質に結合することができるキレート剤の数が、キレート剤の付着において用いるのに適した利用可能な基、例えばアミノ基、の数によって限定される；

15) 免疫反応性蛋白質に結合することができるキレート剤の数が、そのようにして修飾された蛋白質の免疫原性によって限定される；

16) 免疫反応性蛋白質と関連付けることができるイオン性放射性核種の数が、利用可能なキレート部位の数によって限定される。

17) 免疫反応性蛋白質を含む、現在利用可能な種々の放射性核種を用いる放射免疫療法および診断造影は、これらの放射性医薬品が非標的正常組織に結合する可能性があり、この結合が結果として治療に利用する際の正常組織への毒性和診断造影に利用する際の高いバックグラウンド信号を招き得るため、最適状態よりも劣ることがあり得る。

この発明の目的は、現在利用可能な放射標識免疫反応性蛋白質の前記不利益を解消することにある。

## 発明の要約

この発明は、治療処置および組織、特にガン組織、の診断造影に有用なシステムを指向する。ガンのような疾患に対する

では、このシステムには、一次非放射性ターゲッティング免疫試薬および二次放射性送達剤を含む腫瘍指向性連続送達系が包含される。

一つの態様においては、この発明は、レセプター分子の残部、連結基、および免疫反応性物質の残部を含む非放射性ターゲッティング免疫試薬（以下、NRT I Rと呼ぶことがある）であって、興味対象の組織に投与され、それらの細胞の表面上の部位に結合するNRT I Rを指向する。

この態様において、この発明はまた、レセプター分子に非共有的に結合するための親和性を有するリガンドの残部、連結基、および放射性試薬の残部を含む放射性送達剤（以下、RDAと呼ぶことがある）をも指向する。このRDAは、前記NRT I Rが結合している組織の細胞に投与される。特に、このRDAのリガンド残部は、前記興味対象の組織の細胞に結合している前記NRT I Rのレセプターに非共有的に結合する。このため、前記組織に有効量の放射活性が提供される。NRT I Rに結合していないRDAは、組織の周辺部位から迅速に除去することができる。

この態様の一面（以下、システムAと呼ぶことがある）においては、この発明は、ジドロファレートレターゼ酵素（以下、DHFRと呼ぶことがある）のタンパク様活性部位の残部を含むレセプター分子の残部、連結基、および免疫反応性物質の残部を含むNRTIRを包含する。システムAにおいて、この発明はまた、DHFRレセプター分子に非共有的に結合するための親和性を有するリガンド、連結基、および放射活性剤の残部を含むRDAを包含する。

システムAにおいて、この発明は、特に、前記DHFRレセプター分子に非共有的に結合するための親和性を有するリガンドの残部、連結基、およびキレート剤の残部と放射活性剤の残部を含むRDAを伴う、ジドロファレートレターゼ酵素のタンパク様活性部位の残部、連結基、および腫瘍ターゲッティング抗体のような免疫反応性物質の残部を含むNRTIRを指向する。

システムAのNRTIRは、各々、DHFRに非共有的に結合する親和性を有するリガンドの残部を含むRDAと非共有的に結合することができる（n）DHFR分子、および（m）放射活性剤を含んでおり、ここでnは独立に0よりも大きい整数である。抗原当り結合することができる放射活性剤の総数はnとmの積である。これは、（c）放射活性剤に結合する免疫反応性蛋白質を含んでなる従来利用可能な放射免疫複合体の細胞表面抗原への結合とは対称的である。

ここで、（c）の値は0より大きい整数であり、かつ前記抗原に対する免疫反応性を維持しながら前記免疫反応性蛋白質に対してなされ得る結合の数に制限される。この免疫反応性蛋白質の修飾の程度までの制限は、システムAのNRTIRにも適用され、（n）の値は（c）の値には等しい。したがって、この面において、この発明の抗原結合NRTIRへのRDAの非共有結合性結合は、従来利用可能な放射免疫複合体において利用できる最大値（c）を超えるおおよそ（m）の因子により、抗原当りに結合する放射活性剤の最大数を増幅させるであろう。

他の態様において、この発明は、レセプター分子に非共有的に結合するための親和性を発現するリガンドの残部、連結基、および免疫反応性物質の残部を含んであるNRTIRであって、興味対象である組織に投与され、それらの細胞の表面上の部位に結合するNRTIRを指向する。

この態様においては、この発明は、レセプター分子の残部であって、リガンドがこれに対して非共有的に結合するための親和性を有する残部、連結基、および放射活性剤の残部を含んであるRDAであって、この態様のNRTIRが結合している組織の周辺部位に投与されるRDAを指向する。特に、この態様のRDAのリガンドは、前記興味対象の組織の細胞表面に結合しているNRTIRのレセプターに非共有的に結合する。このため、前記組織に有効量の放射活性が提供される。NRTIRに結合していないRDAは、組織の周辺部位から迅速に除去することができる。

特に、この他の態様的一面（以下、システムBと呼ぶことがある）において、この発明は、DHFRレセプター分子に非共有的に結合するための親和性を有するリガンドの残部、連結基、および免疫反応性物質の残部を含んであるNRTIRを包含する。システムBにおいて、この発明はまた、DHFRレセプター分子の残部、連結基、および放射活性剤の残部を含んであるRDAをも包含する。システムBにおいて、この発明は、特に、DHFRレセプター分子に結合するための親和性を有するリガン

ドの残部、連結基、および腫瘍ターゲッティング抗体のような免疫反応性物質の残部を含んであるNRTIRを指向する。システムBにおいて、この発明はまた、DHFRレセプター分子の残部、連結基、およびキレート剤の残部と放射性核種とを含む放射活性剤の残部を含んであるRDAをも包含する。

システムBのNRTIRは、各々DHFRを含むRDAと非共有的に結合することができる、DHFRに非共有的に結合するための親和性を有するリガンドの（n）残部、および（m）放射活性剤を含んでおり、ここでnおよびmは独立に0よりも大きい整数である。抗原当り結合することができる放射活性剤の総数はnとmの積である。これは、（c）放射活性剤に結合する免疫反応性蛋白質を含んである。

幅させるであろう。

である從来利用可能な放射免疫複合体の細胞表面抗原への結合とは対称的である。これらの複合体において、前記抗原に対する免疫反応性を維持しながら前記免疫反応性白質に連結もしくは結合することができる放射活性剤の数に制限される。この免疫反応性白質の修飾の程度までの制限は、システムBのNRTIRにも適用され、(n)の値は(c)の値にほぼ等しい。したがって、この面において、この発明の抗原結合NRTIRへのRDAの非共有結合性結合は、従来利用可能な放射免疫複合体において利用できる最大値(c)を越えるおおよそ(m)の因子により、抗原当たりに結合する放射活性剤の最大数を増幅させるであろう。

この発明はまた、NRTIRおよび薬学的に耐容し得る担体を含有する医薬および診断組成物、並びにRDAおよび

学的に耐容し得る担体を含有する医薬および診断組成物をも指向する。

さらにこの発明は治療方法を指向し、この治療方法は、イン・ビトロもしくはイン・ビボにおいて、この治療を受ける患者の興味対象の組織の周辺部位に治療上有効な量のNRTIRを投与し、続いて、有効期間の経過後、前記組織に治療上有効な量のRDAを投与することを包含する。NRTIRの投与とRDAの投与の間の期間にNRTIRが標的組織の細胞上の部位に結合し、未結合のNRTIRは前記組織の周辺部位から除去される。

さらにこの発明は診断造影法を指向し、この造影法は、イン・ビトロもしくはイン・ビボにおいて、この診断造影を受ける患者の興味対象の組織の周辺部位に診断造影上有効な量のNRTIRを連続的に投与し、続いて、有効期間の経過後、前記組織に診断造影上有効な量のRDAを投与することを包含する。前記有効期間の間に、前記NRTIRは前記興味対象の組織の細胞上の部位に結合し、未結合のNRTIRは組織の周辺部位から除去される。続いて、有効時間の後、前記興味対象の組織の全てもしくは一部の像が得られる。

この発明は、現在利用可能なターゲッティング免疫試薬と比較して、有利な点を提供する。例えば：

組織部位に送達される放射活性剤の治療上有効な量および診断造影上有効な量

の絶縁を、これとは別に現在利用可能なターゲッティング免疫試薬で達成することができるものを越える特異性および倍率で達成することができる；

この発明のNRTIRおよびRDAの標的組織への連続的な送達は、損傷の原因となる非標的組織への放射線の照射を減少させることができる；

高い親和性を有するリガンドのレセプターへの非共有的結合が生じ、この結合は選択性である；

NRTIRおよびRDAは、治療および診断造影用途の両者に用いることができる；

上記NRTIRは、イン・ビボにおいて、正常組織部位には実質的に堆積することなく、腫瘍組織部位に堆積する；

上記NRTIRのイン・ビボ滞留半減期は、腫瘍部位での堆積を可能にするに十分な長さである；

上記RDAのイン・ビボ滞留半減期は、上記NRTIRの滞留半減期よりも短い；

NRTIRに開通付けられる細胞に結合していないRDAは、患者から速やかに除去される；

現在利用可能な放射免疫複合体における放射性核種もしくは放射性核種を含むキレート剤が直接結合しているターゲッティング免疫試薬と同程度の修飾について、この発明の物質および方法を用いることにより、ターゲッティング免疫試薬毎の修飾部位当たりの放射性核種の数を増大させることができる；

NRTIRには、システムAにおいて広く様々な免疫反応性基、連結基、およびDHF活性部位残部を、またシステムBにおいて広く様々な免疫反応性基、連結基、およびDHF活性部位残部に非共有的に結合するための親和性を有するリガンド残部を含めることができる；

RDAには、システムAにおいて広く様々な隙間[spacing]、連結およびキレート基、放射性核種、およびDHFに非共有的に結合するための親和性を有するリガンドの残部を、またシステムBにおいて広く様々な隙間、連結およびキ

レート基、放射性核種およびDHF R活性部位残部を含めることができる; 並びに、

この発明に従つて、広く様々なサイズおよび分子量を有し、かつ腫瘍中の蓄積について特異性を有する、広く様々な組成のものを調製することができる。この発明の他の有利な特徴は、以下の好ましい態様の記述を参照することにより容易に明らかになるであろう。

好ましい態様の記述

好ましい態様において、上記非放射性ターゲットティング免疫試薬 (NRTIR) および放射性送達剤 (RDA) は、下記システム A (4 システム) およびシステム B (4 システム) に表わされる部分を含んでなる。

システム A

非放射性ターゲット ティング免疫試薬		放射性送達剤
NRTIR	RDA	
1 免疫反応性基 + (連結基 + リガンド) $\frac{1}{1}$	+ (連結基 + リガンド) $\frac{1}{1}$	レセプター + (連結基 + キレート剤 + 放射性核種) $\frac{1}{1}$
2 $2-(L_1-DHFR\text{リガンド})\frac{1}{1}$	$2-(L_2-Q-M)\frac{1}{1}$	$Re-(L_2-Q-M)\frac{1}{1}$
3 $2-(L_1-TMP)\frac{1}{1}$	$2-(L_2-Q-M)\frac{1}{1}$	$Re-(L_2-Q-M)\frac{1}{1}$
4 $2-(L_1-MTX)\frac{1}{1}$	$2-(L_2-Q-M)\frac{1}{1}$	$Re-(L_2-Q-M)\frac{1}{1}$

ここで、

Z は免疫反応性基の残部;

Re はレセプター、好ましくはDHF Rの残部;

D は、レセプター、好ましくはDHF Rレセプターに非共有的に結合するための親和性を有するリガンドの残部;

DHF Rリガンドは、DHF R活性部位に非共有的に結合するための親和性を有するリガンドの残部;

TM P はトリメトブリム類似体を含んでなるリガンドの残部;

MTX はメトトレキセート類似体を含んでなるリガンドの残部;

L<sub>1</sub> および L<sub>2</sub> は、各自独立に、別々に剛結合基を含み得る連結基の残部;

Q はキレート基の残部;

M は放射性核種; 並びに

n および m は、各自独立に、0 よりも大きい整数である。

これらの物質の好ましい態様を、以下にさらに記述する。

ここでは、“残部” という用語は、化学的実体を伴う文脈において用いられる。この化学的実体は、例えば、リガンド、またはトリメトブリム類似体、またはメトトレキセート類似体、またはレセプターの一部、またはジドロフォレートレダクターゼ酵素のタンパク様活性部位、またはDHF R、またはキレート基、または放射活性剤、または連結基、または連結基、または蛋白質反応性基、または免疫反応性基

、または免疫反応性物質、または免疫反応性蛋白質、または抗体、または抗体断片、またはヘテロ二官能性架橋剤のような架橋剤、または抗体断片を含んでなる。“残部”という用語は、前記化学的実体の1以上の化学結合が、独立の化学的実体と仮定した場合とは別様に含まれるとき、すなわち、1以上の他の化学的実体との1以上の共有結合を含むように変更され、変性され、もしくは置換されているときに残る、前記化学的実体の部分であると定義されている。したがって、例えば、システムAおよびシステムBの一面において、キレート基の残部は、他の化学的実体の残部、例えば連結基の残部、との結合により少なくとも一価を要して [monovalently] 修飾されたキレート基を含んでなる。

システムAおよびシステムBの両者において、免疫反応性蛋白質は、広く様々な物質には、酵素、アミノ酸、ペプチド、ポリペプチド、蛋白質、脂質タンパク、糖タンパク、脂質、リン脂質、ホルモン、成長因子、ステロイド、ビタミン、多糖、ウイルス、プロトゾア、真菌、バクテリ、リケッチア、カビ、およびそれらの成分、血液成分、組織および臓器成分、医薬、ハブテン、レクチン、トキシン、(オリゴヌクレオチドを含む) 核酸、(モノクローナルおよびポリクローナル) 抗体、抗一抗体、抗体断片、(蛋白質および炭水化物を含む) 抗原性物質、アビシンおよびそれらの誘導体、ビオチンおよびそれらの誘導体、並びに当該分野の熟練者に周知の他の物質が含まれるが、これらに限定されるものではない。加えて、免疫反応性基は、免疫適確性主に与えられたときに、結果として当該物質に結合し得る特異抗体

の產生するいかなる物質であってもよく、あるいはそのように產生された抗原-抗体反応に関与する抗体であってもよい。

好ましい免疫反応性基は、システムAにおけるレセプター分子またはシステムBにおけるリガンド種の残部の反応性基、あるいはここに記述される連結基(L)、と反応するための少なくとも1つの反応性部位を有する限りにおいて、抗体

およびそれらの種々の免疫反応性断片である。前記部位は、免疫反応性種により導入されたものでも、あるいは免疫反応性蛋白質、または抗体断片によって產生される抗体および蛋白質も特に含まれる。

ここで用いられる場合には、“抗体断片”という用語は抗体の残部を含む免疫反応性物質を示し、この抗体は抗原に結合するための親和性を発現することを持つとする。ここで用いられる場合には、親和性という用語は、抗体結合部位(または他のリガンド)と抗原性決定基(またはレセプター)との間の相互作用もしくは結合の強さの、したがって、それらの間の立体化学的適合性の熱力学的表現を指す; これは、まさに、抗体-抗原(またはリガンド-レセプター)相互作用の平衡もしくは結合定数の表現である。抗体断片は、少なくとも、前記抗原に結合するための前記抗体の相対親和性の0.001%ないし1,000%、最も好ましくは1.0%ないし1,000%、より好ましくは0.1%ないし1,000%、最も好ましくは1.0%ないし1,000%の範囲の割合を示す。

抗体断片は、1以上の化学結合開裂反応を含む化学反応によって抗体から; アミノ酸、ペプチド、炭水化物、ここで定義される連結基、および、例えばここに記述されるタンパク反応性基、および、例えばここに記述されるようにな產生される抗体断片を含んでなる群より選択される化学的要素の1以上を反応体として用いる1以上の化学結合形成反応を含む化学反応によって; 並びに、分子生物学的処理、細菌処理、または抗体遺伝子の遺伝子加工を含んでなる処理によって生成させることができる。

抗体断片は、下記反応の1以上を含んでなる化学反応によって抗体から誘導することができる;

- (a) 抗体を含むものの1以上の化学結合の開裂であって、この結合は、例えば、炭素-窒素結合、イオウ-イオウ結合、炭素-炭素結合、炭素-イオウ結合および炭素-酸素結合から選択されるものであり、前記開裂の方法が、
- (i) 当該分野の熟練者には周知のリガンドもしくはペプシンのような酵素等の生化学的触媒の、通常、各々FabおよびFab'2と呼ばれる抗体断片を産

生する作用を含む触媒された化学反応；

(i) 例えば、7もしくはそれ以上のpHで有利に生じる、ヒドロニウムイオンのような求電子性化学触媒の作用を含む触媒された化学反応；

(ii) 例えば、7もしくはそれ以上のpHで有利に生じる、水酸化物イオンのような求核性触媒の作用を含む触媒された化学反応；および

(iv) スルフィドリル基を含んでなる試薬によるジスルフィド結合のイオウ原子での置換反応のような、化学量論的に消費される試薬を用いる置換反応を含んでなる化学反応；

(v) ジスルフィド結合の還元のような還元反応を含んでなる化学反応；

(vi) 岩水化合物分子において生じるような、ヒドロキシル基の炭素-酸素結合の酸化またはヒシナルジオール基の炭素-炭素結合の酸化などの酸化反応を含んでなる化学反応；

から選択されるものであるか、あるいは、

(b) 例えば、炭素-炭素結合（例えば、アミド結合、アミン結合、ヒドロソン結合、およびチオ尿素結合）、ジスルフィド結合のようなイオウ-イオウ結合、炭素-炭素結合、炭素-オイオウ結合、および炭素-酸素結合から選択される1以上の共有結合の形成のような、1以上の反応体間の1以上の化学結合の形成であって、この化学結合形成において、アミノ酸、ペプチド、炭水化物、ここに記述される連結基、ここに記述される间隔基、ここに記述される蛋白質反応性基、上記(a)に記述される抗体断片を含んでなる1以上の試薬を

反応体として用いる化学結合の形成；あるいは、

(c) 抗体断片は、1以上の反応体間に1以上の非共有結合を形成することにより誘導することができる。このような非共有結合は、水性溶媒において、脂肪族および炭素環基を含んでなる領域のような低極性の相互に近接可能な領域を別々に含んでなる化学種間で生じるような疎水性相互作用、並びにオリゴヌクレオチドと相補的オリゴヌクレオチドとの結合において生じるような水素結合相互作用を含んでなる；あるいは、

(d) 抗体断片は、分子生物学の方法の結果として、または、例えば一本鎖免疫反応性基もしくはFv断片の遺伝子工学における、抗体遺伝子の遺伝子加工により生成させることができ。

抗体断片は、上記方法の1以上の組合せの結果として生成させることもできる。

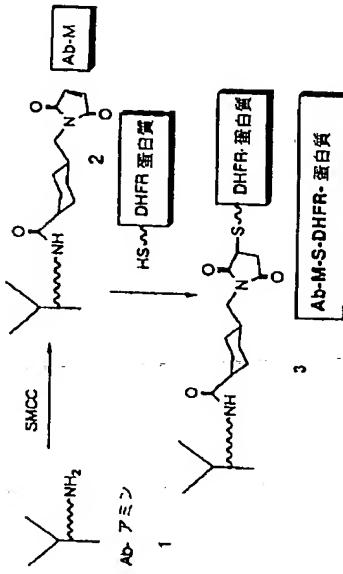
特定の態様においては、免疫反応性基は、システムAにおけるレセプター分子もしくはシステムBにおけるリガンド種、または下記連結基に結合するための反応性基を有する酵素であってもよい。代表的な酵素には、アスパルタン、アミノトランスアミナーゼ、アラニンアミノトランスアミナーゼ、ラクテートアハイドロゲナーゼ、クレアチンホスホキナーゼ、アグリミルトランヌフェラーゼ、アルカリ酸ホスファーゼ、前立腺酸ホスファーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、および種々のエステラーゼが含まれるが、これらに限定されるものではない。

所望であれば、当該分野における熟練者に周知の技術により、免疫反応性基を変性し、もしくは化学的に変更して、システムAにおけるレセプター分子もしくはシステムBにおけるリガンド種の残部、または下記連結基に結合するための反応性基を得ることができる。このような技術には、オリゴヌクレオチドの修飾を指向するWO-A-89/02931および

WO-A-89/02932、並びに米国特許4,719,182号に記述されているような、連結基の診断造影および腫瘍の放射線学的処置への使用が、この発明の組成物の2つの非常に好ましい用途である。したがって、好ましい免疫学的には、腫瘍関連抗原に対する抗体（以下、Abと呼ぶことがある）が含まれる。特定の非限定的な例には、結腸直腸腫瘍を認識するB72.3および関連抗体（米国特許4,522,918号および4,612,282号に記載）、9-2.27および関連抗メラノーマ抗体、結腸直腸腫瘍を認識するD612および関連抗体、小細胞肺カルシノーマを認識するUJ13Aおよび関連抗体、小細胞肺カルシノーマおよび結腸直腸腫瘍（パンーカルシノーマ）を認識するNRLU-10および関連抗体、前立腺腫瘍を認識する7E11C

5および関連抗体、結腸直腸腫瘍を認識するCC49および関連抗体、壞死性組織を認識するTNTおよび関連抗体、結腸カルシノーマを認識するPR1A3および関連抗体、国際特許公開WO-A-90/02569に記述されるING-1および関連抗体、扁平上皮細胞カルシノーマを認識するB174および関連抗体、特定のリンパ腫および白血病と反応するB43および関連抗体、並びに抗HLBおよび関連モノクローナル抗体が含まれる。特に好ましい抗体はING-1である。

### スキーム1



ここで用いる場合には、“レセプター”という用語は、それ自身1つの活性部位を有する分子中の化学基、またはそれ自身1以上の活性部位を有する分子中の化学基の配列、または1以上の化学基もしくは1以上の化学基の配列を含んでなる分子であって、前記基もしくは基(複数)もしくは基の配列が1以上の活性部位を含む分子を指す。レセプターの“活性部位”は、リガンドに結合するための特異的な能力または親和性を有している。“レセプター”という用語、または“レセプター中の活性部位”という用語との使用に関して、“リガンド”という用語は、ここで用いられる場合には、特定の化学基もしくは特定の化学基の配列を含んでなる分子であって、前記分子、基、または基の配列が、レセプター、特にレセプター中の活性部位と相補的であり、かつ結合するた

めの特異的な親和性を有する分子を指す。レセプターの例には、化学反応を触媒する酵素、並びにホルモンおよび薬物と結合する細胞表面レセプターが含まれる。前記酵素に対する基質および薬物の特異的結合部位は前記レセプターの活性部位の例であり、基質、ホルモンおよび薬物の各々は前記レセプターに対するリガンドの例である。

システムAおよびシステムBにおける好ましいレセプター(Rec)は酵素の活性部位の残部を含んでおり、システムAおよびシステムBにおける好ましいリガンドは前記酵素の前記活性部位に対する基質の残物を含んでなる。

特に好ましいレセプターは、シヒドロフォレタクターゼ(DHFR)活性を有する蛋白質の活性部位を含んでなる。前記DHFRはあらゆる源からまるごともしくは部分的に単離し、さらに変性することなくこの発明に用いることができ、あるいは周知の分子生物学の技術により変性し、この発明で用いるために単離することができ、あるいは前記分子生物学的に変性したDHFRをこの発明において用いるために単離する前もしくは後に、その使用においてDHFR活性部位が維持される場合に限り、化学的に変性することができる。

シグマ・ケミカル・カンパニー・カタログ(1992年度版)の350頁によると、DHFR活性はユニットで定義されている；1ユニットのDHFR酵活性は、pH6.5および25°Cで1分当り 1.0マイクロモルの7,8-ジヒドロフォレートおよ

びNADPHを5,6,7,8-テトラヒドロフォレートおよびNADPに変換するために必要な物質の量であると定義されている。したがって、ここで用いられる場合には、7,8-ジヒドロフォレートおよびNADPHの5,6,7,8-テトラヒドロフォレートおよびNADPへの変換を触媒する基もしくは基の配列を含んでなる化学種はDHFR活性を有し、そのような基もしくは基の配列にはジドロフォレートレダクターゼ活性部位、すなわちDHFR、が含まれる。加えて、分子生物学の周知技術または化学変性によるDHFRの変性は、リガンドに結合する蛋白質の能力は保持されているとしても、7,8-ジヒドロフォレートおよびNADPHの5,6,7,8-テトラヒドロフォレートおよびNADPへの変換を触媒する蛋白質の能力を低下させる。

前記D H F R中の活性部位に結合するための親和性を有するリガンドの例には、7,8-ジヒドロフォレート、7,8-ジヒドロフォレートの誘導体および類似体、7,8-ジヒドロフォレートに關してD H F R活性のアゴニストもしくはアンタゴニストになり得る前記誘導体および類似体の残部が含まれる。D H F Rに結合するための親和性を示すリガンドの好ましい例は、"Principals of Drug Action, The Basis of Pharmacology", Third Edition, Churchill Livingstone, New York 1990, Pratt W. B. and Taylor P., Editors, page 623に記述されているよう。また、7,8-ジヒドロフォレートに關してD H F R活性のアンタゴニストである抗フォレート剤を含んでり、かつBlaney, J. M., Hansch, C., Stilipo, C., and

Vittoria, A., Chemical Reviews, (1984), Vol. 84, pp333-407に記述されているようなD H F R活性の阻害剤を含んでるものである。さらなる好ましい例は、前記抗フォレート剤および阻害剤の誘導体および類似体、並びに前記抗フォレート剤および阻害剤の誘導体および類似体の残部を含んでるものである。D H F Rに結合するための親和性を示す特に好ましいリガンドは、抗フォレート剤、ピリメタン、メトトレキセート、テトロキソプリムおよびトリメトブリムの残部を含んでるものである。最も好ましいものは、抗フォレート剤、メトトレキセートおよびトリメトブリムの残部を含んでるものである。

システムAおよびシステムBの一面においては、D H F Rは非ヒト蛋白質を含んでなり、好ましくは細菌もしくは原生動物蛋白質を含んでなり、より好ましくは細菌蛋白質を含んでなる。より好ましくは、前記D H F Rは、*S. aureus*または*E. coli*由來の蛋白質を含んでなる。より好ましくは、前記D H F Rは、*E. coli*

D H F R遺伝子を有するプラスミドp C V29を感染させた*E. coli* (CV634株)に由来する蛋白質を含んでなる。

システムAおよびシステムBの他の面においては、D H F Rはヒト蛋白質を含んでなる。好ましくは、前記D H F Rは組換えヒト蛋白質を含んでなる。より好ましくは、前記D H F Rは、遺伝子工学の技術によって変性された組換えヒト蛋白質であつて、この変性が前記蛋白質のペプチド配列における特定のアミノ酸の独立した組込み、置換、挿入および欠失

である蛋白質を含んでなる。さらにより好ましくは、このように変性された組換えヒト蛋白質を含んでるD H F Rは、基質に結合するための親和性を有し、この親和性が前記基質に対する天然ヒト蛋白質の親和性よりも大きい活性部位を含んでなる。さらにより好ましくは、このように変性された組換えヒト蛋白質を含んでなるD H F Rは、抗フォレート剤、メトトレキセートおよびトリメトブリムの残部に結合するための天然ヒト蛋白質の親和性よりも大きい活性部位を含んでなる。最も好ましくは、このように変性された組換えヒト蛋白質を含んでなるD H F Rは、抗フォレート剤、トリメトブリムの残部に結合するための親和性を有し、この親和性が前記抗フォレート剤の残部に結合するための天然ヒト蛋白質の親和性よりも大きい活性部位を含んでなる。

さらにより好ましくは、システムAのZ-L-Xは融合蛋白質を含んでる。ここで用いられる場合には、"融合蛋白質"という用語は、そのコーディング領域が第2蛋白質の残部のコーディング領域にフレームとして融合している第1蛋白質の残部のコーディング領域を含む、遺伝的に加工された物質を指す。最も好ましくは、前記融合蛋白質は、そのコーディング領域がD H F Rの1以上上の残部のコーディング領域にフレームとして融合している免疫反応性試薬の残部のコーディング領域にフレームとして融合している蛋白質を含む。したがつて、前記融合蛋白質は、最も好ましくは、D H F Rの1以上の残部に融合している免疫反応性試薬の残部を含んでなる。

好ましい態様において、前記融合蛋白質は、適当な堅鍵と結合した場合に前記融合蛋白質が1以上上のD H F Rに連結したF a b断片を含むように、C H<sub>1</sub>領域において免疫グロブリン重鎖に融合しているD H F Rの残部を含んでなる。他の好ましい態様においては、前記融合蛋白質は、C H<sub>1</sub>もしくはC H<sub>2</sub>領域において免疫グロブリン重鎖に融合している1以上上のD H F Rを含むこともできる。さらに別の好ましい態様においては、免疫グロブリン重鎖を含む場合、前記融合蛋白質は1以上上のD H F Rに連結しているF a b' 2断片を含んでよい。さらにまた別の好ましい態様においては、前記融合蛋白質には、免疫グロブリン一本鎖

構造のC末端に融合している1以上のDHF Rを含めることができ、したがつて、1以上のDHF Rに連結しているF<sub>4</sub>断片を含めることができる。

システムAのZ-L-Xを含む上記遺伝子的に加工された融合蛋白質は、そのコードイング領域がヒトもしくは非ヒト第2蛋白質の残部のコードイングフレームとして融合しているヒトもしくは非ヒト第1蛋白質の残部のコードイング領域を独立に含んでなる蛋白質を含むことができる。好ましくは、前記コードイング領域は、独立に、ヒトおよび細菌のものであるか、あるいは上記遺伝子工学技術によって変性されたものである。より好ましくは、融合蛋白質は、そのコードイング領域が細菌もしくはヒトDHF Rまたは遺伝子工学により変性された細菌もしくはヒトDHF Rの1以上の残部のコードイング領域にフレームとして融合しているヒト免疫結合している。

反応性試薬の残部のコードイング領域を含んでなる蛋白質を含むことができる。さらに好ましくは、融合蛋白質は、リガンドに結合するための親和性を有し、この親和性が前記リガンドに対する天然ヒト蛋白質の親和性よりも大きい活性部位を含む活性部位を含むリガンドに結合して達成することができる。ε-アミンであるリシンのような蛋白質のアミン基への活性エチレン基(例えば、マレイミド基)のような活性基の導入をスキーム1に示す。他の技法により好ましくは、融合蛋白質は、メトトレキセートもしくはトリメトアリムのような抗フオレート剤の残部を含むリガンドに結合するための親和性を有し、この親和性が前記リガンドの残部に結合するための天然ヒト蛋白質の親和性よりも大きい活性部位を含む変性組換ヒトDHF Rを含んでなる。

セプターへのリガンドの結合には共有結合の形成を含めることができ、あるいは非共有作用を含めることもできる。この発明においては、好ましくは、セプターへのリガンドの結合には非共有相互作用(以下、非共有結合と呼ぶことがある)が含まれる。

システムAにおいて、DHF Rは免疫反応性基、好ましくは抗体もしくは抗体断片、最も好ましくはING-1に共有結合的に連結し、すなわち結合して、この

システムBの一様において、放射性送達剤「すなわち、Z-(L<sub>1</sub>-Rec)」を形成する。

システムBにおいて、放射性送達剤「すなわち、

DFA、Rec-(L<sub>1</sub>-Q-M)」の一成分としてのDHF Rは、各々連結基により、1以上のキレート基に結合しており、このキレート基は放射性核種と関連付けられている。好ましくは、このキレート基はTMT(以下に記載)であり、連結基は以下に記述するものであり、かつ放射性核種は<sup>90</sup>Yである。

他の態様において、システムBにおけるRDAは、DHF Rの1以上の構成要素、あるいは下記連結基によってDHF Rに結合している1以上の構成要素のいずれかに直接共有結合している1以上の放射性核種を有するDHF Rを含んでなる。好ましくは、前記共有結合している放射性核種は、イオウ原子を含有する基に結合するテクネチウムもしくはレニウムの放射性同位体から選択されるものである。

他の態様において、システムBにおけるRDAは、DHF Rの1以上の構成要素、あるいは下記連結基によってDHF Rに結合している1以上の構成要素のいずれかに直接共有結合している1以上の放射性核種を有するDHF Rを含んでなる。好ましくは、前記共有結合している放射性核種は、イオウ原子を含有する基に結合するテクネチウムもしくはレニウムの放射性同位体から選択されるものである。

システムAにおいては、化学的な結合は、例えば、免疫反応性基上の部位の変性によって導入される連結基(L<sub>1</sub>)の使用を含む技法によって達成することができる。ε-アミンであるリシンのような蛋白質のアミン基への活性エチレン基(例えば、マレイミド基)のような活性基の導入をスキーム1に示す。他の技法には、米国特許4,719,182号に記述された

な化学製品が、非限定的な例として含まれる。

システムAおよびシステムBの両者において、ジチオトレイターのよう

のような還元剤を用いるDHF R(またはジスルフィド結合を含む試薬によつ

て変性されたDHF R) の温和な還元によって導入される連結基 (それぞれ、L-およびL<sub>1</sub>) を用いることにより、化学的な結合が別の方法で達成される。上記還元剤は、還元されたDHF R蛋白質分子にスルフィドリル (SH) 部位を生成させるためのものである。システムAにおいて、そのように還元されたDHF R蛋白質分子を上記マレイミド変性抗体 (A-b-M) に付加することで、1以上のチオエーテル結合によって互いに連結した抗体/レセプター複合体 (A-b-M-*S*-DHF R蛋白質) が生成する。加えて、例えばPierce Chemical Company等から一般に市販される、2つの蛋白質の共有結合に有用な化学製品が、システムAでのDHF Rの抗体への結合における非限定的な例として含まれる。

システムBにおいて、マレイミド基のような活性エチレン基を含んでる連結基の前駆体を含むキレート剤に、還元されたDHF R蛋白質分子を付加することにより、1以上のチオエーテル結合によって互いに連結しているDHF R/キレート剤複合体が得られる。同様に、マレイミド基のような活性エチレン基を含んでなる連結基の前駆体を含むリガンドのエーテル結合によって互いに連結している免疫反応性蛋白質分子ノリガンド複合体が得られる。

システムAにおいては、特に上記試薬が用いられる場合には、他の基もレセプター分子への免疫反応性物質の結合に有用である。免疫反応性物質上およびレセプター分子上の適切な反応部位には以下のものが含まれる；

リシンのアミン部位；  
末端ペチドアミン；

例えば、アスパラギン酸およびグルタミン酸において利用可能であるカルボン酸部位；  
スルフィドリル部位；  
炭水化物部位；

活性化炭素-水素および炭素-炭素結合。これらは、そのように活性化された残基のフリーラジカル反応またはナイトレンもしくはカルベン反応を介する挿入に

より反応することができる；

酸化部位；

還元部位；

チロシンのような芳香族部位；並びにヒドロキシル部位。

システムAにおいて、抗体のような免疫反応性基に対するDHF Rの割合は、約0.5ないし10以上まで広く変えることができる。バルクにおいては、未変性的免疫反応性基およびDHF Rで変性した免疫反応性基を含んでなる混合物も適当

である。そのような混合物は、約0.1ないし約10の免疫反応性基に対するDHF Rのバルク比を有することができる。

システムAでの好ましい態様において、免疫反応性基に対するDHF Rのモル比は約1:1ないし約6:1である。DHF R、特に細菌およびヒトDHF RをコードするDNA配列の知識を以って、遺伝子工学的技法を使用することにより、抗体とDHF R、もしくはそれらの一部との間で融合蛋白質を作製し得ることが特に期待される。これらの抗体に結合したDHF Rの組成物の全てにおいて、DHF Rが、この発明において記述されるリガンドに結合する能力を保持することが期待される。

システムBにおいて、抗体のような免疫反応性基に対するリガンドの割合は、約0.5ないし10以上まで広く変えることができる。バルクにおいては、未変性的免疫反応性基およびリガンドで変性した免疫反応性基を含んでなる混合物も適当である。そのような混合物は、約0.1ないし約10の免疫反応性基に対するリガンドのバルク比を有することができる。好ましい態様において、免疫反応性基に対するリガンドのモル比は、約1:1ないし約6:1である。

システムAにおいて、DHF Rに免疫反応性基、好ましくは抗体もしくは抗体断片を連結させた後、この複合体を、適当な溶出バッファーを用いてSuperose6のようなゲル浸透カラムを通過させることにより、あるいはShodex WS-803Fサイズ排除カラムのようなHPLCカラムから溶出することにより、精製する。これらの方法の両者とも適用された物質を

分子サイズで分離し、結果として、抗体／DHF R複合体を残りの非結合DHF Rとは異なる画分に溶出する。

システムAにおいて、複合体溶液中の抗体の濃度は、ウシ免疫グロブリンを蛋白標準として用いるプラッドフォード [Bradford] (BioRad Catalog #500-0001) により決定する。

システムBにおいて、リガンドの残部に免疫反応性基、好ましくは抗体もしくは抗体断片を連結させた後、この複合体を、適当な溶出バッファーを用いてSuperox6のようなゲル浸透カラムを通してすることにより、あるいはShodexWWS-803カラムのようなHPLCカラムから溶出することにより、精製する。これらの方針の両者とも適用された物質を分子サイズで分離し、結果として、抗体リガンド複合体を残りの非結合リガンドとは異なる画分に溶出する。

システムAにおいて、複合体溶液中の抗体の濃度は、ウシ免疫グロブリンを蛋白

システムAにおいて、標的抗原に結合し、次いでDHF Rに結合する抗体の能力は、ELISAまたはフローサイトメトリーによりアッセイすることができます。同じ材質の保護カラムを購入した、30cm x 7.5mm TSK-G3000SWサイクス排除HPLCカラム (Supelco) を、最終結合における凝集量の決定に用いる

システムBにおいて、標的抗原に結合し、次いでリガンドの残部に結合する抗体。

イタメトリーによりアッセイすることができる。同じ材質の保護カラムを備えた  
 、 $30\text{ cm} \times 7.5\text{ mm}^2$  TSK-G 3000 SW サイズ排除HPLCカラム (Supelco)  
 を、最終結合における凝集量の決定に用いることができる。  
 システムAにおいて、抗体結合DHF Rのジヒドロフォレートレターゼ酵  
 素活性は、Mathews and Huennekens (J. Biol. Chem. 238, 3436-3442 (1963))  
 によって記述されているように、DHF Rによるフォラートのテトラヒドロフ  
 オアレートへの還元の際のジンクレオチドの酸化をたどることにより、アッ  
 セイすることができる。この方法はまだ、この発明において記述されるキレート

効果のアンセイに用いることができる。

システムBにおいて、キレート剤結合DHFRのジヒドロフォラートレダクターゼ酵素活性は、Mathews and Huennekens (J. Biol. Chem. 238, 3436-3442 (1963))による評価法で、DihydroFolate Reductase活性のエントラ

ドロフォレートへの還元の間のビリンヌクレオチドの酸化をたどることにより、アッセイすることができます。この方法はまた、DHF Rに結合するための親和性を有し、かつこの発明において記述される免疫反応性基に連結されている新規リガンドのDHF R阻害効果のアッセイに用いることもできる。

は連結基の残部である。一面において、

「連結基の残部」という句は、ここで用いられる場合には、蛋白質反応性基と蛋白質上の反応部位との反応の結果残り、もしくはその反応から誘導される部分を指す。「蛋白質反応性基」という句は、ここで用いられる場合には、蛋白質上に典型的に見出される官能基と反応し得る基を指す。しかしながら、そのような蛋白質反応性基が関連非蛋白分子上に典型的に見出される官能基と反応し得ることもまた、特に期待される。したがって、一面においては、この発明の実施に有用な連結基L<sub>1</sub>およびL<sub>2</sub>は、反応性基を有する上記関連分子“Z”もしくは“R<sub>e</sub>c”と反応して連結基を形成することができる基から説明される。一面においては、そのように形成される好ましい連結基には、システムAのNRTIRにおける、免反応性基、“Z”、とDHF瑞活性部位含有種、“R<sub>e</sub>c”、との間の連結基、L<sub>1</sub>；システムBのNRTIRにおける免反応性基、“Z”、とDHFリガンド種（例えば、“TMP”もしくは“MTX”）との間の連結基、L<sub>2</sub>；並びにシステムBのRDAにおけるDHF瑞活性部位含有種、“R<sub>e</sub>c”、とキレート剤、“Q”、との間の連結基、L<sub>3</sub>；およびシステムAのRDAにおけるDHF瑞リガンド種（例えば、“TMP”もしくは“MTX”）、とキレート剤、“Q”、“Q”、との間の連結基、L<sub>4</sub>が含まれる。好ましい連結基は、以下から選択されるがこれらに限定されるものではない。

白質反應性基團的遞增

(1) 免疫反応性蛋白質または、反応性基を含む生物学的分子上のアミン、アルキニル もしくはスルフィドリル基

直接反応する基であつて、例えば、クロロメチルフェニル基およびクロロアセチル基 [ $\text{C}_1\text{CH}_2\text{C}(=\text{O})-$ ] 基、2-クロロエチルスルホニルおよび2-クロロエチルカルボニル基を含む活性ハロゲン含有基；ビニルスルホニル；ビニルカルボニル基；エポキシ；イソシアナト；イソチオシアナト；アルデヒド；アリジン；スキンシドキシカルボニル；カルボン酸ハロゲン化物のような活性アシル基；混合無水物等；通常の写真ゼラチン硬化剤として知られる他の基；

(2) 免疫反応性基を含有する変性蛋白質もしくは生物学的分子、すなわち、例えば、蛋白質のアルデヒドもしくはカルボン酸への酸化により、上記(1)に述べられるよう反応性基を含むようになり変性された免疫反応性基を含有する蛋白質もしくは生物学的分子と容易に反応し得る基。前記酸化により変性された場合には、「連結基」はアミノ、アリールアミノ、ヒドロジノ、アカルキルヒドロジノ、アリールヒドロジノ、カルバジド、セミカルバジド、チオカルバジド、チオセミカルバジド、スルフィドリル、スルフィドリルアルキル、スルフィドリスアリール、ヒドロキシ、カルボキシ、カルボキシアルキルおよびカルボキシアリールより選択される蛋白質反応性基から誘導することができる。前記連結基のアルキル部分は、1ないし約20個の炭素原子を有することができ。前記連結基のアリール部分は、約6ないし約20個の炭素原子を有することができる。

白質もしくは生物学的分子、あるいは上記(1)および(2)に示される変性蛋白質に連結する。例えば、ホモ二官能性およびヘテロ二官能性ゼラチン硬化剤、ビスエポキシド、およびビスイソシアネートのような特定の有用な架橋剤の発酵部は、架橋反応の間に、例えば、システムAにおける蛋白質-DHFR活性

四

部位含有種)複合体の一部、すなわち連基になり得る。しかしながら、他の有用な架橋剤は、例えは消費される触媒として、架橋を容易にし、かつ最終複合体にはねだない。そのうえ、架橋剤の例は、光同社特A 421 847 日刊工業新聞

直接反応する基であつて、例えば、クロロメチルフェニル基およびクロロアセチル基 [ $\text{C}_1\text{C}_2\text{H}_3\text{C}(-\text{O})-$ ] 基、2-クロロエチルスルホニル基および2-クロロエチルカルボニル基のよう活性-2-(脱離基置換)-エチルスルホニルおよびエチルカルボニル基を含む活性ハロゲン含有基；ビニルスルホニル；ビニルカルボニル；エボキシ；イソシアナト；イソチオシアナト；アルデヒド；アリジノ；スクシンミニドキシカルボニル；カルボン酸ハロゲン化物のような活性アシル基；混合無水物等；通常の写真ゼラチン硬化剤として知られる他の基；

(2) 免疫反応性基を含有する変性蛋白質もしくは生物学的分子、すなわち、例えば、蛋白質のアルデヒドもしくはカルボン酸への置換により、上記(1)に述べられるような反応性基を含むように変性された免疫反応性基を含有する蛋白質もしくは生物学的分子と容易に反応し得る基。前記置換により変性された場合

には、「連結基」はアミノ、アルキルアミノ、アリールアミノ、ヒドラジノ、アルキルヒドラジノ、アリールヒドラジノ、カルバジド、セミカルバジド、チオカルバジド、チオセミカルバジド、スルフィドリル、スルフィドリアルカルキル、スルフィドリスアリール、ヒドロキシ、カルボキシ、カルボキシアルカルキルおよびカルボキシアリールより選択される蛋白質反応性基から誘導することができる。前記連結基のアルキル部分は、しない約20個の炭素原子を有することができる。

(ウ) 加板剤を用いた壁面の強度化

スルホーSMPB	スルホスクシンミジル 4-(p-マレイミドフェニル)ブレート 2-ミノチオラン
SATA	N-スクシンミジル S-アセチルチオアセテート

前出の記載に加えて、連結基は、その全体もしくは一部が、(両者とも天然のおよび変性された)タクレオチドおよびタクレオチドの残部の相補配列、好ましくは非自己会合オリゴヌクレオチド配列、を含んでなり、並びにそれから誘導されるものであってもよい。アミンおよびスルフィドリル基のような反応性官能基を有する変性ヌクレオチド分子をオリゴヌクレオチド配列に組込むための好ましい有用、かつ非限定的な試薬は、例えば、Clontech Laboratories Inc. (Palo Alto California) から市販されており、Uni-Link Aminomodifier (カタログ# 5190)、Biotin-ON phosphoramidite (カタログ# 5191)、N-MT-C6-Aminomodifier (カタログ# 5202)、Aminomodifier II (カタログ# 5203)、DMT-C6-3'-Amine-ON (カタログ# 5222)、C6-Thiomodifier (カタログ# 521) 等が含まれる。一面においてこの説明の連結基は、上記Clontech試薬において利用可能で、アミンもしくはスルフィドリル基のような反応性官能基(その1つ以上はオリゴヌクレオチド配列に組込まれている)と、ヘテロ二官能性蛋白質反応性基のような前述の蛋白質反応性基の1つ以上(その1つ以上は、例えば、この発明の免疫反応性試薬もしくはDHF R活性部位含有分子、に組込まれている)との反応から誘導される。

システムAのNRTIRにおいて、相補的オリゴヌクレオチドが複合体の2つの構成要素、免疫反応性試薬の配列およびDHF R活性部位含有分子の相補的オリゴヌクレオチド配列、のそれそれに結合する。そこで、2つの相補的オリゴヌクレオチド配列の間に形成されるハイブリッドは、DHF R活性部位含有分子と1以上のキレート剤を含んでなる構成要素との間に連結基を有する。

システムBのRDAにおいて、相補的オリゴヌクレオチドが複合体の2つの構成要素、1以上のキレート剤を含んでなる残部の配列およびDHF R活性部位含有分子の相補的オリゴヌクレオチド配列、に結合する。そこで、2つの相補的オリゴヌクレオチド配列の間に形成されるハイブリッドは、DHF R活性部位含有分子と1以上のキレート剤を含んでなる構成要素との間に連結基を有する。もちろん、システムBにおいて、同じオリゴヌクレオチド配列の2つ以上のコピービーを、例えば、1つのDHF R活性部

位含有分子にタンデムに連結させることができ、多数のキレート剤を含んでなる相補的オリゴヌクレオチド配列を加えることも可能である。そこで、2つの相補的オリゴヌクレオチド配列の間に形成される複合ハイブリッドは、DHF R活性部位含有分子と多数のキレート剤との間に連結基を有する。

同様に、システムBにおいて、上記相補性オリゴヌクレオチドハイブリッドを用いて、DHF Rに非共有的に結合するための親和性を有する1以上のリガンドの残部を免疫反応性基に結合させることができる。

同様に、システムAにおいて、多数のDHF R配列を免疫反応性蛋白質に結合させることができ。同じように、システムAにおいて、上記相補的オリゴヌクレオチドハイブリッドを用いて、DHF Rに非共有的に結合するための親和性を有する1以上のリガンドを、多数のキレート剤に結合させることができる。

システムAおよびシステムBにおけるQはキレート基の残部を表わす。この発明のキレート基は、放射性核種が結合していくともよい、広く多様なキレート剤の1つ以上の残部を含んでよい。よく知られているように、キレート剤は、配位結合によって金属原子と結合してキレート錯体もしくはキレートと呼ばれる環状構造を形成する供与原子を含む化合物である。この類の化合物は、Kirk-Othmer *Encyclopedia of Chemical Technology*, Vol.5, 339-368に記述されている。

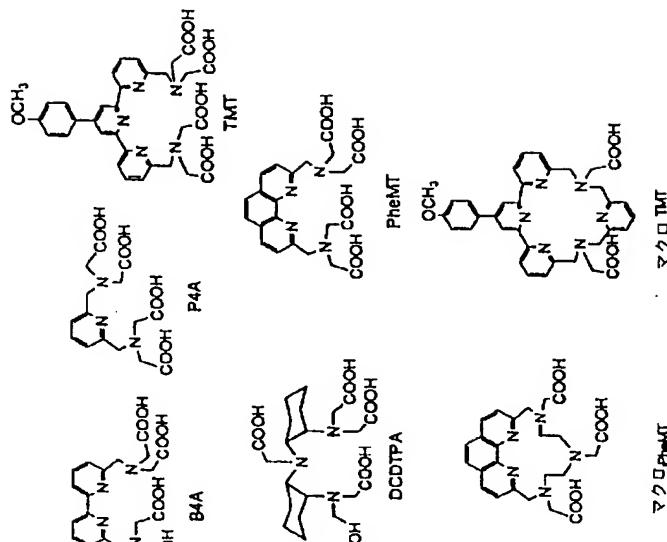
適切なキレート剤の残部は、ナトリウムトリポリホスフェートおよびヘキサメタホスホン酸のようなポリホスホネット；  
 エチレンジアミン四酢酸、N-(2-ヒドロキシエチル)エチレンジアミン三酢酸、  
 ニトリロ三酢酸、N,N-ジ(2-ヒドロキシエチル)グリシン、エチレンビス(ヒドロキシフェニルグリシン)およびジエチレントリアミン五酢酸のようなアミノカルボン酸；アセチルアセトン、トリフルオロアセチルアセトン、およびテノイリトリフルオロアセトンの1,3-ジケトン；酒石酸、クエン酸、グルコン酸、および5-スルホサリチル酸のようなヒドロキシカルボン酸；エチレンジアミンジエチレントリアミン、トリエチレンテトラアミン、およびトリアミノトリエチルアミンのようなポリアミン；トリエタノールアミンおよびN-(2-ヒドロキシ

エチル)エチレンジアミンのようなアミノアルコール；2,2'-ジビリジル、2,2'-ジイミダゾール、ジビコリジアミンおよび1,10-フェナントロリンのような芳香族ヘテロ環状塩基；サリチルアルデヒド、ジスルホビロカドコール、およびクロモトロビン酸のようなフェノール；8-ヒドロキシキノリンおよびオキシムスルホン酸のようなアミノフェノール；ジメチルグリオキシムおよびサリチルアルドオキシムのようなオキシム；ポリシスティン、ポリスチジン、ポリアスパラギン酸、ポリグルタミン酸、もしくはそれらのアミノ酸の組合せのような、近接キレート官能性を有するペプチド；ジサリチルアルデヒド；1,2-ブロビレンジiminのようなシップ塩基；トラフェニルボルフィンおよびフタロシアニンのようないドビロール；トルエンジオール、メソ-2,3-ジメルカブトコハグ酸、ジメルカブトブロバノール、チオグリコール酸、カリウムエチルキサ

ンテート、ナトリウムジエチルジチオカルバメート、ジチゾン、ジエチルジチオリソ酸、およびチオ尿素のようなイオウ化合物；ジベンゾ[18]クラウン-6、(CH<sub>3</sub>)<sub>9</sub>-4,11-ジエン-<sup>4</sup>、および(2,2,2-トリブリート)のような合成大環状化合物；およびニトリロトリメチレンホスホン酸、エチレンジアミントラ(メチレンホスホン酸)、およびヒドロキシエチリジンホスホン酸のようなホスホン酸、または以上の化合物の2以上の組合せから別々に選択することができる。

キレート剤の好ましい残部はポリカルボン酸基を有し、かつエチレンジアミン-N,N,N',N'-四酢酸(EDTA)；N,N,N',N'-ジエチレントリアミン五酢酸(DTPA)；1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-N,N',N',N''-四酢酸(DOTA)；1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-N,N',N',N''-三酢酸(OTTA)；およびトランス(1,2)-シクロヘキサノジエチレントリアミン五酢酸(CTPA)を含む。

キレート剤の好ましい残部はポリカルボン酸基を有し、かつB4A、P4A、TMT、DCDTPA、PhMeT、マクロPhMeT、およびマクロTMTを含む。



一面においては、キレート剤の他の適切な残部は、米国特許5,078,985号に記述される、テクネチウムおよびレニウムのような金属のキレートのために変性された蛋白質を含んでなる。前記米国特許の開示は参考することによりここに組込まれる。

他の面においては、キレート剤の適切な残部は、例えは米

国特許4,444,690号；4,670,545号；4,673,562号；4,897,255号；4,965,392号；4,980,147号；4,988,496号；5,021,556号および5,075,099号に記述されるような

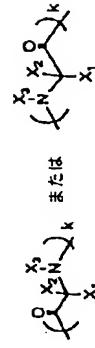
、N<sub>2</sub>およびN<sub>3</sub>S<sub>2</sub>含有化合物から誘導される。

キレート剤の他の適切な残部はPCT/US91/08253に記述されており、この開示は参考することによりここに組込まれる。Qが多数のキレート剤の残部を含んでなる場合には、そのような剤は前述されるような連結基の1つ以上により

互いに連結され得る。

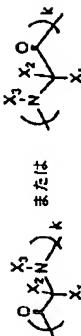
キレート剤Qの残部は、化学結合または前述のしのような連結基により、この発明の他の構成要素と独立に連結する。好ましい連結基にはまた、アミノ、イミド、ニトリロおよびイミノ基のような基における窒素原子；メチレン、エチレン、プロピレン、ブチレンおよびヘキシンのような、好ましくは1ないし18個の炭素原子を有するアルキレンであり、酸素、窒素および硫黄のようなヘテロ原子またはヘテロ原子含有基によって注意に中断されているアルキレン；カルボニル；スルホニル；スルフィニル；エーテル；チオエーテル；エステル、すなわち、カルボニルオキシカルボニル；チオカルボニルオキシカルボニル；チオカルボニルチオ、チオカルボニル、チオカルボニルオキシ、およびオキシチオカルボキシ；アミド、すなわち、イミノカルボニルおよびカルボニルイミノ；チオアミド、すなわち、イミノチオカルボニルおよびチオカルボニルイミノ；チオ；ジチオ；リン酸塩；ホスホン酸塩；ウレレン；チオウレレン；ウレタン、すなわち、イミノカル

およびアルキル部分が好ましくは上記のものであるヘテロサイクリアルアルキル；またはペプチド結合、すなわち、基



ここで、 $k > 1$  であり、各Xは、独立に、上記 $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$ について記述され基を表わす。例えば、アルカリエンイミノおよびイミノアルキレンのように2以上の連結基を用いることができる。他の連結基、例えば、上記し、もしくはし、について記述されるような蛋白質ヘテロ二官能性およびホモ二官能性結合および架橋化学において通常用いられる連結基、もここでの使用に適している可能性が期待される。特に好ましい連結基には、キレート剤上のイソチオシアネート基を介してキレート剤の残部に連結する場合に、チオ尿素基を形成するアミノ基が含まれる。

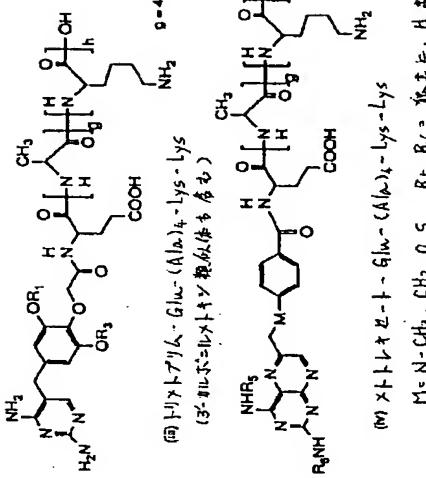
連結基は、キレート剤Qとこの発明の他の構成要素との結合反応を妨害しない、種々の置換基を有することができる。そうではなくて、そのような反応を妨害するものの、当該分野において周知の適切な保護基でそのような振舞いか妨げられたり、結合反応の後に適切な脱保護により再生される置換基を有することもできる。連結基はまた、結合反応の後に導入される置換基を有することもできる。例えば、連結基は、F、C1、BもしくはIのようなハロゲン；アミド基；好ましくは1ないし約18、より好ましくは6ないし4個の炭素原子を有する、メチル、エチル、プロピル、1-ブロピル、チルのようなアルキル；好ましくは6ないし約20、より好



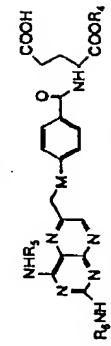
ましくは6ないし10個の炭素原子を有する、フェニル、ナフチル、ヒドロキシフェニル、ヨードフェニル、ヒドロキシヨードフェニル、フルオロフェニルおよびメトキシフェニルのような置換もしくは非置換のアリール；好ましくは7ないし約12個の炭素原子を有する、ベンジルのようなアラルキル、好ましくは5ないし7個の炭素核およびS、N、Pもしくはのような1以上のヘテロ原子を有するヘテロサイクリルであって、その好ましい基の例がビリジル、キノリル、イミダゾリルおよびチエニルであるヘテロサイクリル；ヘテロサイクリルお

は非置換のアラルキル；アルキル部分が、上記アルキルについて述べられているように、好ましくは1ないし18個の炭素原子を有するアルコキシ；エトキシベンジルのようないアルコキシアルキル；好ましくは5ないし7個の炭素核とS、NもしくはOのようないアロ原子とを有し、好ましい非置換基の例がビリジル、キノリル、イミダゾリルおよびチエニルである置換もしくは非置換のヘテロサイクリル；カルボキシル基；アルキル部分が好ましくは1ないし8個の炭素原子を有するカルボキシアルキル；またはキレート基の残部のような置換基で置換することができる。

DHF R活性部位結合誘導体、トリメトアリム類似体、およびメトレキセート類似体の残部：



R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>はともにR<sub>3</sub>は、ホスヒ、H、もしくは  
低級アルキル、アリール、アラカル、もしくは  
アルキレンカルボン酸もしくはアミド導体  
から選択される。



R<sub>5</sub>、R<sub>6</sub>はHまたは低級アルキル  
から選択される。

(42)

(43)

(44)

(45)

(46)

(47)

(48)

(49)

(50)

(51)

(52)

(53)

(54)

(55)

(56)

(57)

(58)

(59)

(60)

(61)

(62)

(63)

(64)

(65)

(66)

(67)

(68)

(69)

(70)

(71)

(72)

(73)

(74)

(75)

(76)

(77)

(78)

(79)

(80)

(81)

(82)

(83)

(84)

(85)

(86)

(87)

(88)

(89)

(90)

(91)

(92)

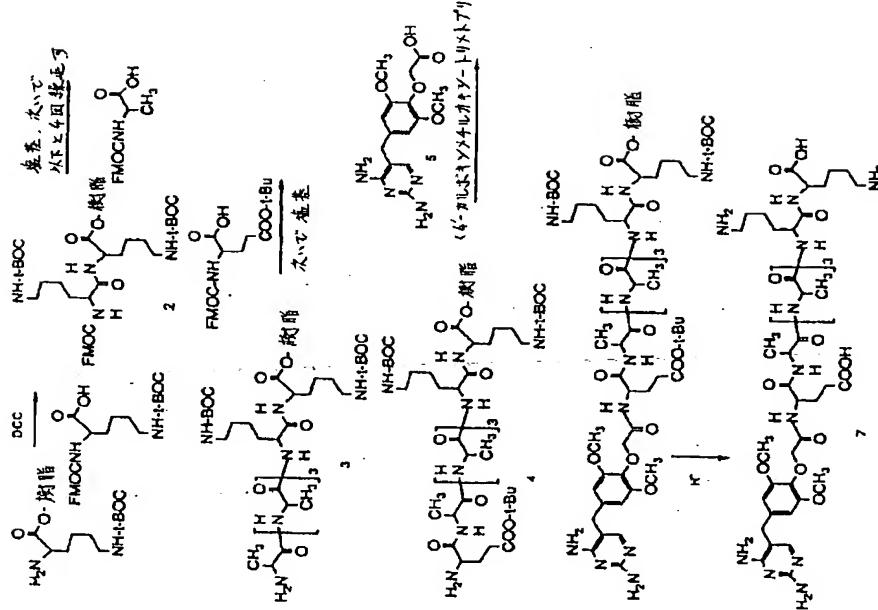
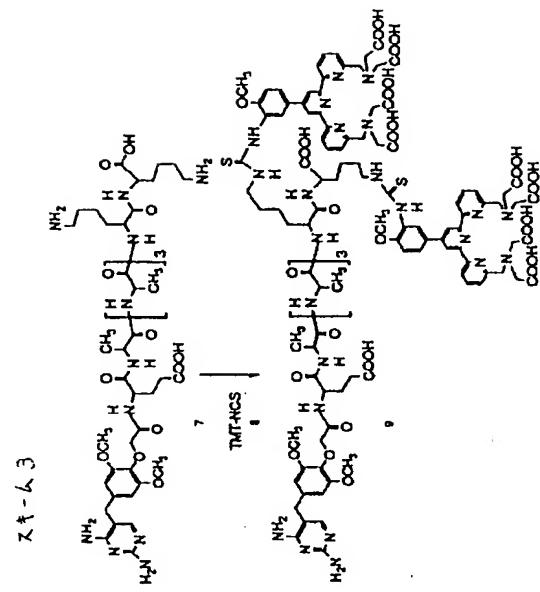
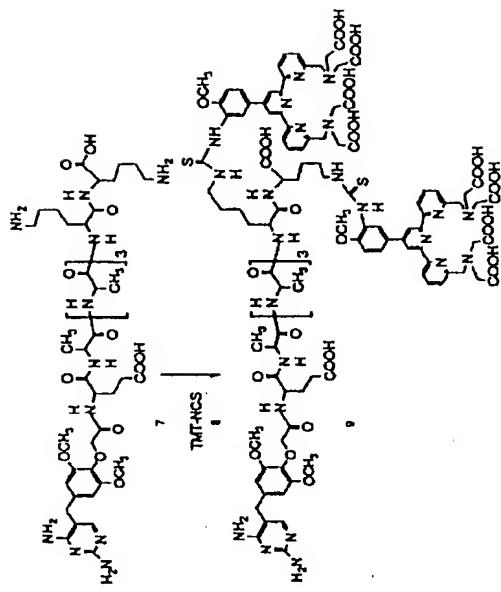
(93)

(94)

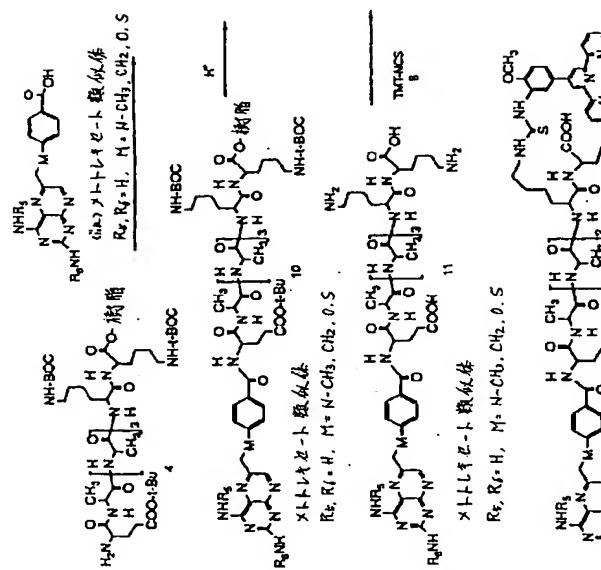
(95)

(96)

<img alt="Chemical structure of a trimethoprim-like derivative. It features a purine ring system with amino groups (NH2) at positions 6 and 9. It is substituted with a 4-aminobutyl group, a 4-(2-h

X<sup>4</sup>-L<sub>2</sub>X<sup>4</sup>-L<sub>3</sub>

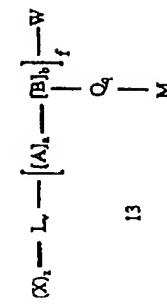
卷之四



システムAおよびBにおいて、この発明に有用な、DHF活性部位に非共有的ために結合するための親和性を有するリガンドの特定の例には、Rahman et al, Metothretate and Its Analogs; Medicinal Research Reviews, Vol 8, No.1, 95-157およびKuyper et al, Carboxy-substituted Trimethoprim Analogs; J. Med. Chem. Vol 28, 303, (1985) に列挙されるトリメトブリム類似体およびメトトレキセート類似体の現物が含まれる。好ましい類似体には、リガンドの一部と、システムBにおける免疫反応性種Z、およびシステムAにおけるキレート剤Qとの結合を可能にする、もしくは容易にする反応性基を各々含む、構造(i)および

〔構造 (ii) で空養生カバーのが全く無い〕

この発明の実施に有用なトリメトブリム類似体を含んでなるリガンドには、上記構造 (i) で定義される誘導体であつて、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、およびR<sub>3</sub>の1つもしくは2つについて好ましい基としてのメチル)、アラルキル、アリール(置換アリールを含む)、アルキレンカルボン酸もしくはそれらのアミド誘導体、1つ以上のヘテロ原子を含有するアルキレン基(例えば、酸素[エーテルもしくはヒドロキル基として]またはイオウ[チオエーテル基として]があるが、これに限定されるものではない)、アミノ酸基およびペプチド基から独立に選択され、かつ-R<sub>1</sub>、-R<sub>2</sub>、および-R<sub>3</sub>の少なくとも1つが下記構造13で表わされる形態にある誘導体が含まれる。



ここで、Xは、酸素、イオウもしくは窒素のやうなヘテロ原子の1つ以上を有することができる、ないし12個の炭素原子を有するアルキレン基；Iは上に定義される連結基であって、好ましくはアミド基の残部、化学結合、アミノ酸残部、もしくは1つ以上のヒドロキシル基で置換されているもよいアーリエン基；Aはアルキレン基、ポリアルキレンオキシジル基、アミノ酸残部、ペプチド残部、Xまたはヘテロ原子（例えば、ヒドロキシル基、カルボン酸基もしくはそれらの塩、アミド基、エーテル基の1つ以上の形態にある酸素、チオエーテル、スルホン、スルホキシドもしくはスルホネットの形態にあるオウ、アミノ基、アミド基もしくはジアソン結合の形態にある窒素、またはリシン酸塩の形態にあるリン）を含むペンシダント置換基を有する基；BはAから選択されるが、上に定義されるキレート剤Qによってそれらに結合されている1つ以上の放射性核種を含むように変性されおり、前記キレート剤QとしてはTMT基もしくはDTPA基、大環状キレート基、イオウ原子を含有するキレート基、塩素原子を含有するキレート基、ビリジン環を含むするキレート基、およびカルボン酸基もしくはリシン酸塩基。

を有するキレート基を

挙げができるが、これらに限定されるものではない；WはH、アルキル、アルキル、アルキレン、カルボン酸基、アミノ基、アミド基、アリール基、ヒドロキシアリール基、構造(i)の構成要素に共有結合することができる(ヨウ素等の)原子の治療上有効かつ診断上有効な放射性同位体[キレート基を介して構造(i)の構成要素に結合することができるイオンの治療上有効もしくは診断上有効な放射性同位体と区別されるもの]、イットリウム、インジウム、レニウム、銅、錫、スカンジウム、ビスマス、鉛もしくはロイチカム[leuticum]のような金属イオンの治療上有効もしくは診断上有効な放射性同位体Mを有することができるキレート基；xおよびyは独立に0もしくは1；aは0もしくは1ないし約100の整数；b、q、およびfは独立にないし約100の整数である。

システムAのRDAにおいて、連結基の非限定的な例には、保護された(L)-G1u-(A1a), -LyS-LyS(4)の残部の他に保護された(D)-G1u-(A1a), -LyS-LyS(4)の残部が含まれる。4'-カルボキシメチルオキシトリメトリム(構造5)およびメトトレキセート類似体(構造ii-a)の両者は結合反応を受け(スキーム2、3および4を参照)、次いで脱保護され、トリメトリム-(D)-G1u-(A1a), -LyS-LyS(構造ii-i)およびメトトレキセート(構造iv)、並びに各々の相同L-G1u含有種が得られる。合成スキーム(2、3、4)は、トリメトリム-ヘプタベブチド(構造ii)およびメトトレキセート-ヘプタベブチド(構造3)のN末端にセブチル(tBu)ブロック化D-G1uを付加した後、得られたヘプタベブチド(構造4)を4'-カルボキシメチルオキシトリメトリム(構造5)と結合させてトリメトリム-ヘブタベブチド(構造6)を得る。ペブチド(構造6)により、所望のトリメトリム-D-G1u-(A1a), -LyS-LyS(構造7)が得られる。トリメトリム-D-G1u-(A1a), -LyS-LyS(構造7)のリガンド-キレート剤複合体であるトリメトリム-D-G1u-(A1a), -[LyS-(TMT)](構造8)で処理することにより(スキーム3)、所望のリガンド-キレート剤複合体であるトリメトリム-D-G1u-(A1a), -[LyS-(TMT)]-[LyS-(TMT)](構造9)が生成する。0.5M酢酸ナトリウムで緩衝された脱イオン水中にトリメトリム-D-G1u-(A1a), -[LyS-(TMT)]-[LyS-(TMT)](構造9)を含む溶液を、pH約6.0、室温で、"Y

得られる。ヘキサベブチド(構造3)のN末端にセブチル(tBu)ブロック化D-G1uを付加した後、得られたヘブタベブチド(構造4)を4'-カルボキシメチルオキシトリメトリム(構造5)と結合させてトリメトリム-ヘブタベブチド(構造6)を得る。ペブチド(構造6)により、所望のトリメトリム-D-G1u-(A1a), -LyS-LyS(構造7)が得られる。トリメトリム-D-G1u-(A1a), -LyS-LyS(構造7)のリガンド-キレート剤複合体であるトリメトリム-D-G1u-(A1a), -[LyS-(TMT)](構造8)で処理することにより(スキーム3)、所望のリガンド-キレート剤複合体であるトリメトリム-D-G1u-(A1a), -[LyS-(TMT)]-[LyS-(TMT)](構造9)が生成する。0.5M酢酸ナトリウムで緩衝された脱イオン水中にトリメトリム-D-G1u-(A1a), -[LyS-(TMT)]-[LyS-(TMT)](構造9)を含む溶液を、pH約6.0、室温で、"Y

により、相同L-G1uトリメトリム誘導体質が得られる。類似の合成方法、ヘブタベブチド(構造4)と安息香酸誘導体4'-カルボキシメトトレキセート(構造ii-a)との結合反応(スキーム4)を用いることにより、所望のブロック化メトトレキセート-D-G1u-(A1a), -LyS-LyS(構造10)が生成する。(構造10)の酸性脱ブロック化によりメトレキセート-ヘブタベブチド(構造11)が得られ、これをTMT-NCSと反応させることにより所望のメトレキセート-D-G1u-(A1a), -[LyS-(TMT)]-[LyS-(TMT)]-[LyS-(TMT)](構造12)が得られる。0.5M酢酸ナトリウムで緩衝された脱イオン水中にメトレキセート-D-G1u-(A1a), -[LyS-(TMT)]-[LyS-(TMT)](構造12)を含む溶液を、pH約6.0、室温で、"Y"YCl<sub>3</sub>のHCl水溶液で処理し、放射性核種標識("Y")メトレキセート-D-G1u-(A1a), -[LyS-(TMT)]-

〔〕 〔〕  $\mathbf{u} \mathbf{s} = (\mathbf{T} \mathbf{M} \mathbf{T})$  〕 〔〕 得  $\mathbf{z}$

アロック化-L-G-Iu誘導体を用いることを除いて、類似の方法を用いることにより、相同-L-G-Iu-トリケチカーティン導物質が得られる。

上記トリメトプリムおよびメトレキセートのDおよびジェナンチオマーのラセミ混合物もまた、この説明において有用である。

例えは、さらなる  $Lys-TMT$  および  $Lys-TMT$  - 放射性核種基を含む異なる相同ペプチドを調整することにより、キレート剤およびキレート剤に結合している放射性核種がさらに取り込まれる。好ましくは、このようないし約 6、より好ましく  $Lys-TMT$  および  $Lys-TMT$  - 放射性核種残部の数は 1 ないし約 6 である。

システムBにおいて、NRTIRは、DHFR活性部位に非共有的に結合するための親和性を有し、各々免疫反応性基（Z）に結合している、適切に置換されずに連結基（L<sub>1</sub>）を有する1つ以上のリガンドを含んでなる。好ましくは、DHFR活性部位に非共有的に結合するための親和性を有する前記リガンドは、上に連結基L<sub>1</sub>によってZに連結している（導造i）または（導造ii）の構成で定義される連結基L<sub>1</sub>は、そのどううを基を、好ましくは2ない約10個

より好ましくは2ないし約4個含む。  
システムBにおける送達剤は、上に定義される連結基を介して1つ以上のキレート剤に結合しているDHFR活性部位部分を含んでなる。

もししくは混合することにより、容易にキレート剤と錯体を形成することが望ましい。この塩はいかなる塩でもよいが、好ましくは金属の水溶性塩、例えばハロゲン塩、であり、より好ましくは金属イオンとキレート剤との結合を妨げないよう多くのものが選択される。キレート剤含有分子は、好ましくは約5ないし約9の範囲のpHの、より好ましくは約6ないし約8の範囲のpHの水溶液の形態にある。

八

キレート剤含有分子は、ケン酸塩、酢酸塩、リン酸塩およびホウ酸塩のような緩衝塩と混合して最適pHを生じせめることができる。好ましくは、前記緩衝塩は、徐々にヨウ化鉄への金属イオンの結合を妨げないように選択される。

治療への適用において、この発明のRDAは、好ましくは、治療用途に有効なキレート剤に対する金属放射性核イオンの比を有している。好ましい態様においては、キレート剤当たりの金属イオンのモル比は約1:100ないし約1:1である。

診断造影への適用においては、この発明の RDA は、好ましくは、診断造影用途に有効なキレート剤に対する金属放射性核種イオンの比を有している。好ましい態様においては、キレート剤当りの金属イオンのモル比は約 1:1,000 である。

他の様様においては、この発明のRDAは、金属イオンの非放射性同位体を含むことができる。この金属イオンは、IIA族ないしVIA族の元素から選択することができるが、これらに限定されるものではない。好ましい金属には、原子番号12, 13, 20, 水銀元素21-33, 38-52, 56, 77-84を上に88。

のもの、並びにランタニド系列（原子番号57-71）のものが含まれる。他の元素においては、この発明のRDAは放射性核種を含むことができる。この放射性核種は、例えば、Sc、Fe、Pb、Ga、Y、Bi、Mn、Cu、Cr、Zn、Ge、Mo、Tc、Ru、In、Sn、Sr、Sm、Lu、Sb、W、Re、Po、TaおよびTlの放射性同位体から選択することができる。好ましい放射性核種には、<sup>63</sup>Sc、<sup>67</sup>Cu、<sup>67</sup>Co、<sup>111</sup>In、<sup>212</sup>Pb、<sup>198</sup>Ga、<sup>199</sup>Y、<sup>133</sup>Sm、<sup>212</sup>Bi、<sup>99</sup>Tc、<sup>166</sup>Reおよび<sup>186</sup>Reが含まれる。これらのうち、<sup>99</sup>Yが特に好ましい。これらの放射性同位体は、原子状態であっても、あ

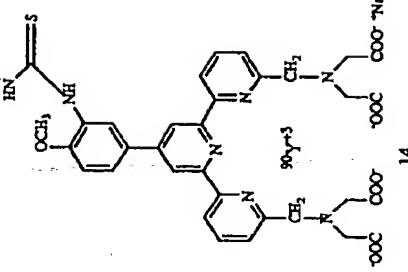
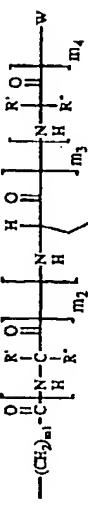
るには、対しまくは、イオン状態であつてもよろしい。  
他の態様においては、この発明のRDAは蛍光性金属イオンを含んでいてもよい。この蛍光性金属イオンは、原子番号57ないし71の金属から選択することができるが、これらに限定されるものではない。以下の金属のイオンが好ましい：La, Ce, Pr, Nd, Pm, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, T

三、Yb、Y<sub>2</sub>SiO<sub>5</sub>、Eu<sub>2</sub>O<sub>3</sub>が特に好ましい。

他の態様においては、この説明のRDAは、MRI用途における使用に適した1つ以上の常磁性元素を含むことができる。この常磁性元素は、原子番号21ないし29、43、44および57ないし71の元素から選択することができる。以下の元素が好ましい: Cr、V、Mn、Fe、Co、Ni、Cu、La、

Ce, Pr, Nd, Pm, Sm, Eu, Gd, Tb, Dy, Ho, Er, Tm,  
Yb,  $\text{Eu}^{3+}$ , Mn, Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub>の性質<sup>1,2)</sup>

が上に定義される通りの上記解説 (i) であり、好ましくは  $R_1$ 、 $R_2$ 、および  $R$  の 1つつかれ並んで用ひられるべきである。

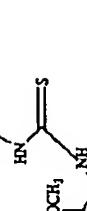
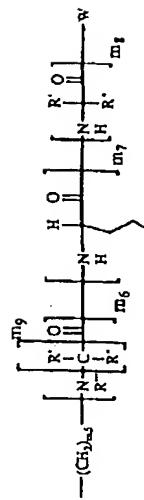


に非天然アミノ酸および天然アミノ酸のラセミ体を含むアミノ酸の構成要素から選択され、かつR'およびR"は、独立に、H、ポリアルキレンオキシジル基、さらなるキレート基、例えばTMT、を有していてもよい分岐ペプチド基から選択することができ；

Wは、OH、NH、TMTの残部、O-メチル基のようなO-アルキル基、およびN.R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>から選択され、ここでR<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>は、独立に、メチル基のようなアルキル基、H、およびPEGが45ないし5,000ダルトンの範囲の平均分子量を有するPEG-OHおよびPEG-O-アルキル(例えば、PEG-O-CH<sub>3</sub>)のよ

この発明における有用性を有する構造の他の例は、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、およびR<sub>3</sub>が上に定義される通りの上記構造(i)であり、好ましくはR<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、およびR<sub>3</sub>の1つが構造15によつて表わされるものである。

ここで、R' および R" は、例えば、グリシン、アラニン、ロイシン、セリン、リシン、イソロイシン、クルタミン、アスパラギン酸、グルタミン酸、プロリン、トレオニン、バリン、フェニルアラニン、チロシンのような天然アミノ酸並び



びN.R.、R.から選択され、ここでR.R.は、独立に、メチル基のようなアルキル基、H、およびPEGが45ないし5,000ダルトンの範囲の分子量を有するPEG-OHおよびPEG-O-アルキル（例えば、PEG-O-CH<sub>3</sub>）のようなボリアルキレンオキシド分子から選択され；

R'は、0および1ないし約12の整数から選択され；並びに

R'''は、HおよびTMT分子の残部から選択され。前記T

M.T分子は放射性核種を含み、もしくは含んでおらず、かつ前記TMT分子はチオ尿素基を介して連結している。

この発明の他の態様においては、同一の処方において、少なくとも2種の金属イオンを他方との組合せで含んでなるRDAが特に期待される。例えば、前記RDAの薬学的に有効な処方において、治療上有効な量の“Y”のような放射性核種を診断造影上有効な量のCd<sup>4+</sup>のような常磁性イオンと共に、放射性核種イオノのモル濃度に対する診断造影に有効なイオンのモル濃度の比が典型的には1を越える状況で用いることにより、患者の治療処置の間にホスト患者の組織の少な

くとも一部の同時磁気共鳴造影が可能となる。

この発明の他の態様においては、ヨウ素の放射性同位体の使用が特に考慮される。例えば、システムAまたはシステムBのRDAが、共有結合形成反応においてヨウ素によって化学的に置換される置換基、例えばヒドロキシフェニル官能性を有する置換基、を含む場合には、そのような置換基を該当分野において周知の方法によってヨウ素の放射性同位体で標識することができる。このように共有結合したヨウ素種は、前述の方法で、治療および診断造影用途に用いることができる。

ここで、R'およびR''は、例えば、アリシン、アラニン、ロイシン、セリン、リシン、イソロイシン、グルタミン、アスパラギン酸、グルタミン酸、プロリン、トレオニン、バリン、フェニルアラニン、チロシンのような天然アミノ酸並びに非天然アミノ酸および天然アミノ酸のラセミ体を含むアミノ酸の構成要素から選択され、かつR'およびR''は、独立に、H、ポリアルキレンオキシジル基、1ないし約10個のさ

らなるキレート基、例えばTMT、を有していてもよい分校ペプチド基から選択することができる；  
m<sub>1</sub>は1ないし10の整数、m<sub>2</sub>、m<sub>3</sub>およびm<sub>4</sub>は、m<sub>1</sub>が少なくとも1、好ましくは2ないし約5であるという条件下で、独立に、0および1ないし10の整数から選択され；  
Wは、OH、NH<sub>2</sub>、TMT分子、O-メチル基のようなO-アルキル基、およ

び尿素基を介して連結している。

好ましい態様において、薬学的に許容し得る媒体中の上記システムAまたはシステムBのRDAの有効投与量は、RDAの前駆体（この前駆体は、システムAにおいてはDHF R活性部位に非共有的に結合するための親和性を有するリガンドの残部、連結基、およびキレート剤の残部、システムBにおいてはDHF R活性部位の残部、連結基、およびキレート剤の残部を含んでなる）の組成物を、放射性金属イオンをそのモル量が前記組成物におけるRDAを含むキレート基の

モル量よりも少なくなるように含む組成物に、RDAへの金属イオンの取り込みを可能にするのに有効な期間持続して晒すことにより調製することができる。

好ましい態様においては、薬学的に併容し得る媒体中の上記システムAまたはシステムBのNRTIRの有効投与量が患者に投与され、前記NRTIRが患者の腫瘍部位のような標的部位に蓄積される。続いて、有効な時点で、薬学的に併容し得る媒体中の有効投与量のRDAが前記患者に投与され、RDAが標的部位に蓄積される。この標的部位は、患者の腫瘍部位に蓄積される前記NRTIRである。

好ましい態様においては、薬学的に併容し得る媒体中の上記システムAまたはシステムBのNRTIRの治療上有効な投与量が患者、もしくは患者由来の組織に投与され、患者の腫瘍部位のような標的部位にNRTIRが蓄積される。続いて、治療上有効な時点で、薬学的に併容し得る媒体中の上記RDAの治療上有効な投与量が患者に投与され、RDAが標的部位に蓄積される。この標的部位は、患者の腫瘍部位に蓄積される前記NRTIRである。

この発明はまた、非毒性の生理学的に併容し得る担体、アジュバントもしくはヴィーケル【vehicles】(ここではこれらをまとめて担体と呼ぶ)と共に、非経口注入、経口投与(固体もしくは液体形状)、あるいは直腸もしくは局所投与等のための組成物中に処方された1種以上の上記NRTIRを含む。この発明はまた、非毒性の生理学的に併容し得る担体、アジュバントもしくはヴィーケル【vehicles】(ここではこれらをまとめて担体と呼ぶ)と共に、非経口注入、経口投与(固体もしくは液体形状)、あるいは直腸もしくは局所投与等のための組成物中に処方された1種以上の上記RDAを含む。

この組成物は、ヒトおよび動物に、経口、直腸、非経口(直腸内、筋肉内もしくは皮下)、膣内、腹腔内、腫瘍内、局所(粉末、軟骨もしくはドロップ)投与のいずれかに

より、または頸もしくは鼻用スプレーとして投与することができる。NRTIRとRDAとを同じ経路、例えば経口、直腸、非経口(直腸内、筋肉内もしくは皮

下)、膣内、腹腔内、腫瘍内、局所(粉末、軟骨もしくはドロップ)投与で、または頸もしくは鼻用スプレーとして投与できることが特に期待されている。

また、NRTIRがRDAとは異なる経路で投与可能であることも期待されている。

非経口注入に適した組成物は、生理学的に併容し得る無菌の水性もしくは非水性溶液、分散液、懸濁液もしくは乳液、および注入可能な無菌の溶液もしくは分散液に用いたための無菌の粉末を含むことができる。適切な水性および非水性担体、希釈剤、溶媒もしくはヴィーケルには、水、エタノール、ポリオール(プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、グリセロール等)、それらの適切な混合液、(オリーブ油のような)植物油、並びにオレイン酸エチルのような注入可能な有機エスチルが含まれる。例えば、レシチンのようなコーティングを用いることにより、分散液の場合には求められる粒子サイズを維持することにより、並びに界面活性剤を用いることにより、適切な流動性を維持することができる。これらの組成物は、保存剤、温潤剤、乳化剤および分散剤のようなアジェバントを含むこともできる。微生物の作用の予防は、種々の抗菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸等により、確実なものとすることができる。等張剤、例えば、糖、塩化ナトリウム等を含むことも望ましい。吸収を遅らせる成分、例え

ば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを用いることにより、注入可能な製剤の吸収を引き延ばすことができる。

経口投与のための固形投与単位には、カプセル、錠剤、ビル、粉末および顆粒が含まれる。このような固形投与製剤においては、活性化合物は、不活性の慣習的賦形剤(もしくは担体)、例えば、クエン酸ナトリウムもしくはリン酸二カルシウム、または(a)充填剤もしくは增量剤、例えば、アンプン、乳糖、ショ糖、グルコース、マンニトールおよびケイ酸、(b)結合剤、例えば、カルボキシメチセルロース、アルギン酸【alginates】、ゼラチン、ポリビニルビロリドン、ショ糖およびアラビアゴム、(c)保湿剤、例えば、グリセロール、(d)崩壊剤、例えば、寒天、炭酸カルシウム、ジャガイモもしくはタピオカテンプ

ン、アルギン酸、特定の複合シリケートおよび炭酸ナトリウム、(e) 溶液凝固遮延剤、例えば、パラフィン、(f) 吸取促進剤、例えば、第四アンモニウム化合物、(g) 懸濁剤、例えば、セチルアルコールおよびモノノステアリン酸グリセロール、(h) 吸着剤、例えば、カオリンおよびベントナイト、甘味料、調味料および香料を含めることが可能である。

懸濁液は、活性化合物に加えて、懸濁剤、例えば、エトキシル化イソステアリルアルコール、ポリオキシエチレンソルビトールおよびソルビタンエステル、微結晶セルロース、アルミニウムメタヒドロキシド、ペントナイト、寒天およびトカラガカントゴム、またはこれらの物質の混合物を含んでよい。

類似のタイプの固形組成物を、高分子量ポリエチレングリ

コール等の他にラクトース、すなわち乳糖のような賦形剤を用いて、ソフトおよびハードゼラチンカプセルにおける充填剤として用いることができる。錠剤、糖衣丸、カプセル、ビルおよび顆粒のような固形製剤は、腸溶コーティングおよび他の当該分野において周知のコーティングのようなコーティングおよびシェルを備えて調製することができる。これらは懸濁剤〔opacifying agents〕を含んでいてもよく、また、腸管の特定の部分において活性化合物（単体もしくは複数）を遅延様式で放出するような組成物であってよい。使用可能な包埋組成物の例はポリマー性物質およびワックスである。

適当な場合には、上述の賦形剤を用いて、活性化合物をマイクロカプセルの形態とすることもできる。

経口投与のための液体製剤には、薬学的に許容可能な乳液、溶液、懸濁液、シロップおよびエリキシルが含まれる。液体製剤は、活性化合物に加えて、当該分野において通常用いられる不活性希釈剤、例えば水もしくは他の溶媒、可溶化剤および乳化剤、例えば、エチルアルコール、ベンジルベントノート、プロビレングリル、酢酸エチル、ベンジルアルコール、ベンジルベントノート、プロビレングリル、1,3-ブチレンジコール、ジメチルホルムアミド、油類、特に綿油、シロップ、コーン胚芽油、オリーブ油、ヒマシ油およびゴマ油、グリセロール、テトラヒドロフルフラルアルコール、ポリエチレングリコールおよびソルビタンの脂肪酸エステル、またはこれらの物質の混合物を含んでよい。

このような不活性の希釈剤に加えて、組成物に湿润剤、乳

化剤および懸濁剤のようなアジュバント、甘味料、調味料および香料を含めることが可能である。

懸濁液は、活性化合物に加えて、懸濁剤、例えば、エトキシル化イソステアリルアルコール、ポリオキシエチレンソルビトールおよびソルビタンエステル、微結晶セルロース、アルミニウムメタヒドロキシド、ペントナイト、寒天およびトルカラガカントゴム、またはこれらの物質の混合物を含んでよい。

直腸投与のための組成物は、好ましくは座剤である。この座剤は、この発明の化合物を、カカオバター、ポリエチレングリコールもしくは座剤ワックスのようないくつかの適当な非刺激性の賦形剤と混合することにより調製することができる。上記カオバター、ポリエチレングリコールもしくは座剤ワックスは、普通の温度では固体であるが体温では液体であり、したがって、直腸内もしくは陰腔内で溶融して活性成分を放出する。

この発明の化合物の局所投与のための剤形には、軟膏、粉末、スプレーおよび吸入剤が含まれる。活性成分は、無菌条件下で、生物学的に許容しうる担体並びに、必要に応じて、保存剤、緩衝剤もしくは噴射剤と混合される。服用剤方、服用軟膏、粉末および溶液もまた、この発明の範囲内にあるものとして考慮される。

この発明の組成物中の活性成分の実際の投与レベルは、特定の組成物および投与方法について所望の治療応答を得るために有効な活性成分の量が得られるようになる。したがって、選択される投与レベルは、投与経路、所望の治療期間および他の要素に対する所望の治療効果に依存する。

分割された投与量の1単位がホストに投与される、この発明の化合物の一投与量の総量は、例えば、体重kg当たり約1ナノモルないし約5マイクロモルの量であり得る。投与単位組成物は、一日投与量を構築し得るその総量となるような量を含むことができる。しかしながら、特定の患者に特有の投与レベルは、体重

一般的な健康、性別、食事、投与の時間および経路、吸収および排泄の速度、他の薬物との組合せ、並びに治療される特定の疾患の重篤性を含む様々な因子に依存することは理解されるであろう。

他の態様においては、この発明は、診断造影上有効な量のこの発明の組成物を診断を必要とする哺乳動物またはこの哺乳動物の組織に投与することを指向する。この発明による、医療過程において用いるための診断造影の方法は、診断造影を必要とする被試験体の身体に、有効診断像形成量 [effective diagnostic image producing amount] の上述の組成物を投与することを包含する。

この方法においては、薬学的に許容し得る媒体中に含まれる、有効診断像形成量の、上述の非放射活性ターゲッティング免疫試薬 (NRTIR) が患者に投与され、前記放射活性ターゲッティング免疫試薬が前記患者の腫瘍部位のような標的部位に蓄積される。この標的部位は、前記患者の腫瘍部位に蓄積される前記非放射性ターゲッティング免疫試薬である。これによりイメージバターンを可視化することができる。

あるいは、NRTIRを、診断造影を受ける患者の目的の組織の周辺部位に投与する前に、放射性核種を含んでなる試薬の診断造影上有効な量と反応させ、有効な時間をおく、この間に前記NRTIRが前記目的の組織の細胞上の部位に結合し、かつ未結合のNRTIRが前記組織の周辺部位から除去され、然る後、前記目的の組織の全体もしくは一部の像を時間の関数として得ることができる。前記目的の組織の全体もしくは一部の像が最適のものである場合には、診断造影上もしくは治療上有効な量の、NRTIRと同じ、もしくは異なる放射性核種を含むRDAを前記患者の前記目的の組織に投与する。

ヒト患者に加えて、被試験体には、ウサギ、イヌ、ネコ、サル、ヒツジ、アダマ、ウマ、ウシ動物等の哺乳動物種を含むことができる。

この発明の組成物を投与した後、投与された組成物が被検体内に幅なく分配され、哺乳動物の組織内に入るに十分な時間被検動物を維持する。十分な時間とは、一般に約1時間ないし約2週間以上、好ましくは約2時間ないし約1週間である。

以下の例はこの発明をさらに説明するものであり、いかなる意味においても明細書および請求の範囲を限定するものとして解釈されるものではない。この発明の特定の態様が以下の例において説明されている。

## 例

## 例1

5-(4'-ヒドロキシ-3',5'-ジメトキシベンジル)-2,4-ジアミノビリミジン-300mlのエチレングリコール中22g(0.2モル)の2,4-ジアミノビリミジンおよび49.5g(0.2モル)の2,6-ジメトキシ-4-[ (N,N-ジメチルアミノ)メチル]フェノール塩酸塩の溶液に、11g(0.203モル)のナトリウムメトキシドを添加した。この反応混合物を室温存在下で搅拌しながら150-160°Cに加熱した。この温度でジメチルアミンが生成した。3時間後、理論量の80%のジメチルアミンが採取された。溶媒を減圧下(85°C)で除去し、残った油を水、次いでアセトンで洗浄した。生成物は黄褐色の沈殿として得られた(収量25g)。

## 例2

5-(4'-メトキシカルボニルメチルオキシ-3',5'-ジメトキシベンジル)-2,4-ジアミノビリミジン-80mlのDMSO中の5-(4'-ヒドロキシ-3',5'-ジメトキシベンジル)-2,4-ジアミノビリミジン(5.52g; 20ミリモル)をt-BuOH(2.469g; 22ミリモル)およびメチルプロモアセテート(3.366g; 22mM)と14時間反応させた。溶媒を減圧下で除去し、残った固体を純度と重炭酸ナトリウムで澈しく振盪した。明るい褐色の固体を滤過し、乾燥させて所望のエスセル1.5gを得た、mp 149-151°C。より純度の低い物質である第2クロップ(3g)もまた単離した。これら2つを、例3における加水分解のために合わせた。

## 例3

5-(4'-カルボキシメチルオキシ-3',5'-ジメトキシベンジル)-2,4-ジアミノビリミジン、トリメトブリム-4'-O-酢酸

5-(4'-メトキシカルボニルメチルオキシ-3',5'-ジメトキシベンジル)-2,4-ジアミノビリミジン (4.5 g; 15.48 mM) を 50 ml の 2 M NaOH に溶解した。透明な溶液を 60°C で 4 時間加熱し、冷却し、一晩静置した。形成された白色沈殿を滤過し、次いでエーテルで洗浄した後乾燥させた。收量: 20 g; 熔点 274°C. H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) : δ 7.5 (S, 1 H) 、 6.53 (S, 2 H) 、 6.08 (S, 2 H) 、 5.69 (S, 2 H) 、 3.9 (S, 2 H) 、 3.7 (S, 6 H) および 3.50 ppm (S, 2 H)。マススペクトル (C1) : MH<sup>+</sup> = 357 (N<sub>a</sub> \*塩)

H<sub>2</sub>N-[D-Glu] = Ala-Ala-Ala-Ala-Lys-Lys-OH の觸製

直線ペプチド H<sub>2</sub>N-[D-Glu] = Ala-Ala-Ala-Ala-Ala-Lys-OH を、固相方法論により、ABI 430A 自動化ペプチド合成機を用いて合成した。この合成において用いられる固体支持体は、4-アルコキシベンジルアルコールポリスチレン樹脂 (Wang) 樹脂

であった。合成の過程を通して、D-Glu に対する t-アブチル側鎖保護および Lys の側鎖に対する t-BOC 保護を備えた N-*a*-Fmoc 保護基を用いた。ペプチド鎖は、Fmoc-化学のための ABI FastMoc (商標) ソフトウェアプロトコル (0.25ミリモルスケール、HBTU活性化結合、4倍過剰のアミノ酸、1時間) を用いて組み立てた。

H<sub>2</sub>N-[D-Glu]-Ala-Ala-Ala-Ala-Lys-Lys-OH のトリメトブリム-4'-O-酢酸の觸製

上記ペプチド-樹脂の N 末端への例 3 のトリメトブリム-4'-O-酢酸の付加を、順に手で加えることにより行なった: 25 ml の DMSO 中の 335 mg のトリメトブリム (1 ミリモル) 、 525 μL のジイソプロピルエチラミン (3 ミリモル) 、次いで 380 mg の HBTU (1 ミリモル)。この混合物を室温で 2 時間反応

させ、終了時点で混合物を滤過し、ペプチド樹脂を 3 × 50 ml の DMF 、次いで 3 × 50 ml の MeOH で洗浄した。

ペプチドの除去および脱保護は、密封容器中で、ペプチド-樹脂に 95: 5 TF A/H<sub>2</sub>O 15 ml 溶液を添加し、室温で 2 時間振盪することにより達成した。2 時間の最終時点で、焼成ガラスロートに注ぐことによりこの混合物を滤過した。次いで、滤液の体積をローター-エバボレーションによって減少させて油としたり (2.3 ml)。その後、この油を 50 ml の Et<sub>2</sub>O を貯容する遠心管に滴下する。により、ペプチド

を析出させた。このペプチドを回転で沈降させ、エーテルでテカンテーションを行なって、空気乾燥させた。

## 例4

放射性核種標識 (<sup>3</sup>H) - トリメトブリム-D-Glu-(Ala)-Lys-OH の触製 (スキーム 1 および 2)

150 ml の塩化メチレン中に D-Glu-(COOtBu) - (Ala) - Lys-tBOC-Lys-tBOC (4; 30 mM) および DCC を含む樹脂の混合物に、100 ml の塩化メチレン中の 5-(4-カルボキシメチルオキシ-3',5'-ジメトキシベンジル)-2,4-ジアミノビリミジン (すなわち、トリメトブリム-4'-O-酢酸) (5; 30 mM) の溶液の一部を加える。得られた反応混合物を 2 日間攪拌し、溶媒および尿素を除去して、ブロック化トリメトブリム-4'-O-酢酸ペプチド (6) を生成させる。これは、トリフルオロ酢酸での穏やかな加水分解の際に、トリメトブリム-4'-O-酢酸ペプチド (7) を生じる。

50 ml の塩和重炭酸ナトリウム水溶液中にトリメトブリム-4'-O-酢酸ペプチド (7) を含む約 pH 9 の溶液を、TMT-イソチオシアネート (8; 20 mM) と室温で 12 時間反応させ、トリメトブリム-4'-O-酢酸-D-Glu-(Ala) 4-[Lys-(TMT)] - [Lys-(TMT)] (9) を得る。

0.5M 酢酸ナトリウムで緩衝された pH 6.0 の脱イオン水中に上記トリメトブリム-4'-O-酢酸-D-Glu-(Ala)

a)  $[-\text{Ly s} - (\text{TMT})] - [\text{Ly s} - (\text{TMT})] - (9)$  を含む溶液を室温で、塩酸水溶液中に<sup>90</sup>YCl<sub>3</sub>を含む溶液で処理する。キレート剤への放射性ラベルの取り込みは、薄層クロマトグラフィーにより示される。加えられた<sup>90</sup>Yの97%超がトリメトアリム-4'-O-酢酸-D-Glu-(Ala)-[Ly-(TMT)]-[Ly-(TMT)]と結合して所望の<sup>90</sup>Y-標識生成物が形成される。

## 例5

放射性核種標識 (<sup>90</sup>Y) - メトトレキセート-D-Glu-(Ala)-Ly

$-\text{(TMT)} - \text{Ly s} - (\text{TMT})$  の調製 (スキーム 3)

150m l の塩化メチレン中のD-Glu-(COOtBu)-(Ala)-[Ly-(tBOC)] - (Ly s - tBOC) - (Ly s - tBOC) を含む樹脂 (4 : 30mM) と DCC との混合物に、100m l の塩化メチレン中に4'-カルボキシメトレキセート (4' : 30mM) を含む溶液を少しづつ添加する。得られた反応混合物を2日間攪拌し、溶媒および尿素を除去してプロック化メトレキセート-ヘプタペプチド (10) を得る。これは、4N HClでの懸やかな加水分解の際に4'カルボキシメトレキセート-ヘプタペプチド (11) を生成する。

50m l の塩化メチレン中に4'カルボキシメトレキセート-ヘプタペプチド (11 : 20mM) を含む溶液を TMT-イソチオシアネートと室温で12時間反応させ、4'-カルボキシメトレキセート-D-Glu-(Ala)-[Ly s - (TMT)] - [Ly s - (TMT)] - (12)を得る。

1) 容器の放射性塩化イットリウム (>500Ci/mg) の活性を有する、0.04M 塩酸中に含まれる<sup>90</sup>Y (Amersham-Mediphysics) を2容積の0.5M酢酸ナトリウム pH 6.0を用いて中和し、0.5M酢酸ナトリウムで緩衝された脱イオン水中に上記4'-カルボキシメトレキセート-D-Glu-(Ala)-[Ly s - (TMT)] - [Ly s - (TMT)] - (12) を含む pH 6.0の溶液に室温で添加する。標識を1時間行った後、0.1Mクエン酸ナトリウム、pH 6.0で展開する Gelman ITAL-SGストリップを用いて、薄層クロマトグラフィーにより標識効率を決定する。加えた<sup>90</sup>Yの97%超が4'-カルボキシメトレキセート-

、取り込まれ、所望の<sup>90</sup>Y-標識生成物が形成される。

以下の例は、抗体とジドロフォレートレダクターゼ (DHFR)との複合体の構造を説明するものである。これらの例においては、方法論のために ING1 (キメラ IgG1抗体) が選択される；ここに記述されるような他の抗体も有用である。以下に参照される DHFRからの組換え生成物として産性される細菌由来のもの、あるいは組換え蛋白質として利用可能なヒト由来のものである。

## システムAの例

システムA		
	非放射性ターベック ティング免疫試薬 N R T I R	放射性送達剤 R D A
1	免疫反応性基 + (連結基 + レセプター) <sub>1</sub>	リガンド + (キレート剤 + 放射性核種) <sub>1</sub>
2	$Z - (L_1 - Rct) \frac{1}{1}$	$D - (L_2 - Q - M) \frac{1}{1}$
3	$Z - (L_1 - Rct) \frac{1}{1}$	トリメトブリム $- (L_2 - Q - M) \frac{1}{1}$
4	$Z - (L_1 - Rct) \frac{1}{1}$	メトトレキセート $- (L_2 - Q - M) \frac{1}{1}$

ここで、

Z は免疫反応性基の残部；  
Rct はレセプター、好ましくは DHFR の残部；  
D は、レセプター、好ましくは DHFR レセプターに非共有的に結合するための親和性を有するリガンドの残部；  
DHFR リガンドは、DHFR 活性部位に非共有的に結合するための親和性を有するリガンドの残部；

TMPはトリメトブリム類似体の残部；  
 MTXはメトトレキセート類似体の残部；  
 L1およびL2は、各々独立に、別々に間隔基を含み得る連結基の残部；  
 Qはキレート基の残部；  
 Mは放射性核種；並びに  
 nおよびmは、各々独立に、0よりも大きい整数である。

例6 (6 a) スルホ-SMCC (ING-1-マレイミド) [Z-L1] を有する抗体-マレイミドの調製

PBS中にスルホ-SMCCを含む溶液(36ナノモル)を試料であるリン酸緩衝液(pH7)中にキメラ抗体(ING-1; 6ナノモル)を含む溶液に添加した。得られた混合物を時々混合しながら、室温で30分間静置した。この反応混合物をリン酸緩衝生理食塩水で希釈し、予備洗浄したPD-10カラム(Pharmacia)に入れ、PBSで溶出してING-1-マレイミドを得た。この物質は使用時まで水上で保存した。

(6 b) メルカブトアルキル-抗体 [Z-L1] の調製

試料である、0.1M炭酸塩緩衝液(pH8.8)中にキメラ抗体(ING-1; 6ナノモル)を含む溶液を、200ナノモルの2-イミノチオラン水溶液と混合する。得られた混合物を、時々混合しながら、室温で30分間静置する。この反応混合物をリン酸緩衝生理食塩水で希釈し、予備洗浄したPD-10カラムに入れ、PBSで溶出してメルカブトアルキル-ING-1を得る。この物質は、使用時まで水上で保存する。

(6 c) SATAを用いるメルカブト-抗体の調製

PBS中に6ナノモルのING-1を含む溶液を、60ナノモルのSATA(DMSO中)を添加しながら激しく搅拌する。この反応混合物をPBSで希釈し、PD-10カラムからPBSで溶出させてING-1-CO-CH<sub>2</sub>-S-CO-CH<sub>2</sub>を得る。

H<sub>2</sub>-SH)は、直ちに使用される。

(6 d) ING-1の<sup>125</sup>Iでの標識

ING-1のアリコート(500μg)を、(約5mCi/mgの)<sup>125</sup>Iモノクロライドを用いて、500μLの容積の100nMリン酸緩衝液(pH7.2)中のヨードゲン[iodogen](ナトリウムN-クロロベンゼンスルホンアミド)ビーズの存在下において、室温で標識する。15分後、標識抗体を予備洗浄したNAP-5カラム(Pharmacia)に流すことにより反応を停止させる。放射性ヨウ素化された蛋白質をPBSで溶出し、使用時まで4℃で保存する。

例7

(7 a) SATAを用いるメルカブト-DHFRの調製

PBS中に50ナノモルのDHFRを含有する溶液を、500ナノモルのSATA(DMSO中)を添加しながら激しく搅拌する。混合し、室温で60分間静置した後、反応混合物をPBSで希釈し、PD-10カラムからPBSで溶出させて、DHFR-CO-CH<sub>2</sub>-S-CO-CH<sub>2</sub>を得た。100nM

リン酸ナトリウム、25mM EDTA、50mM NH<sub>4</sub>OHを含有するpH7.5の溶液25μLを添加することにより、このアセチルチオアセチル化DHFRの脱保護を行なう。この反応は室温で2時間行ない、その後この物質をPBSで溶出することにより再びPD-10カラムに流す。最終生成物であるDHFR-CO-CH<sub>2</sub>-SHは、直ちに使用される。

(7 b) メルカブトアルキル-DHFRの調製

試料であるDHFR(50ナノモル)を0.1M炭酸塩緩衝液(pH9)に溶解し、2-イミノチオランの2ミリモル水溶液を添加する。この反応体を激しく混合し、室温に120分間保持する。この反応混合物を2ミリモルのエタノールアミンを添加することにより停止させ、リン酸緩衝生理食塩水で希釈する。この反応混合

物を予備洗浄したPD-10カラムに加え、PBSで溶出させてDHFR-HC ( $\text{NH}_3^+$ )  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{SH}$ を得る。マレイミド誘導体化されたING-1 [male imide-derivatized ING-1] (例6 a)との結合に用いるたためには、この生成物をカラムから直接抗体溶液中に溶出する。

(7 c) ジチオトレイトルを用いる還元されたDHFRの調製

PBS中に40ナノモルのDHFRを含有する溶液を微しく搅拌し、PBS中に500nMのジチオトレイトルを含有する溶液を等容量を添加した。混合し、水上に60分間静置した後、反応混合物を予備洗浄したPD-10カラムからPBSで溶出させ、DHFR-SHを得た。マレイミド誘導体化され

た抗体 (例6 a) に結合するために、この生成物をカラムから直接抗体溶液中に溶出させた。

(7 d) スルホ-SMCCを用いるDHFR-マレイミドの調製

スルホ-SMCCのPBS溶液 (300nM) を、リン酸緩衝液 (pH 7) 中に試料であるDHFR (50ナノモル) を含む溶液に添加する。得られた混合物を時々搅拌しながら室温で30分間静置する。この反応を60ナノモル塩基性トリス緩衝液を用いて停止させる。この反応混合物をリン酸緩衝液で希釈し、予備洗浄したPD-10カラムに入れ、PBSで溶出してDHFR-マレイミドを得る。この物質をブールし、4℃で一晩、透析緩衝液 (20mMトリス、1.0mM K, EDTA; pH 7.2) に対して透析した後、Centricon-10 (登録商標、Amicon) 装置において約1.0mg/mL蛋白の濃度に濃縮する。その後、この物質を透析スルフィドリル基を有する抗体と反応

(7 e)  $^{125}\text{I}$ を用いるDHFRの放射標識

DHFRのアリコート ( $500\mu\text{L}$  の容積の100mMリン酸緩衝液 (pH 7.2) 中のヨードグリドを用いて、 $500\mu\text{L}$  の容積の100mMヨウ素化DHFTRとPBSで溶出し、使用時まで4℃で保存する。

(7 f) DHFR活性部位を保護する代替結合方法

誘導体生成過程 [derivation process] における試薬とDHFR酵素の活性部位との相互作用を妨げるために、酵素の活性部位をブロックして試薬の侵入

を防ぐ。

メトトレキセート/ノアガロース (Sigma) カラム樹脂スラ

リー (1mL:光遮断) を大容量の高濃度緩衝液 (100mM KPO<sub>4</sub>、1.0M KC1、1.0mM K, EDTA および0.5mMジチオエリスリトル、pH 6.0) で2回洗浄して遊離のメトトレキセートを除去する。最終的に遊離したペレットを、(50mM KPO<sub>4</sub>、1.0mM K, EDTA および0.5mMジチオエリスリトル、pH 6.0) を含有する緩衝液5.0mL中ににおいて、DHFR (1ミリモル/5mL) と混合し、1時間放置する。ここでDHFRが結合した樹脂を遠心してペレットにし、洗浄緩衝液 (50mM KPO<sub>4</sub>、1.0mM K, EDTA、pH 6.0) で3回洗浄する。この樹脂ペレットを、PBS (pH 7) 中にスルホ-SMCを含む溶液 (6ミリモル) に懸濁する。得られた混合物を室温で60分間非常にゆっくりと搅拌する。この反応を10mLの洗浄緩衝液で希釈することにより停止させ、樹脂を再度遠心してペレット化して洗浄緩衝液で2回洗浄する。この樹脂を、出口をガラスツールの栓で塞いた細いガラスバ尔斯ツールビベットに注ぐ。マレイミド誘導体化DHFRを、30mLの溶出緩衝液 (100mMギ酸、200mM KBO<sub>3</sub>、1.0M KC1、1.0mM K, EDTA、pH 9.0) で樹脂から除去することにより、DHFR-マレイミドを得る。この物質をブールし、4℃で一晩、透析緩衝液 (20mMトリス、1.0mM K, EDTA; pH 7.2) に対して透析した後、Centricon-10 (登録商標、Amicon) 装置において約1.0mg/mL蛋白の濃度に濃縮する。その後、この物質を透析スルフィドリル基を有する抗体と反応させることにより反応を停止させる。ヨウ素化DHFRとPBSで溶出し、使用時まで4℃で保存する。

マレイミドDHFR (例7 a) もしくは抗体-DHFR複合体 (下記例8を参照) をDEAE-SEPHACELカラム (Pharmacia) にかけることにより、抗体の活性部位からフォレートを除去する。このカラム (~50mL樹脂) をDEAE-洗浄緩衝液 (10mMトリス、1.0mM K, EDTA、0.2mMジチオエリスリトル; pH 7.2) で洗浄し、同じ緩衝液中の蛋白質をかける。洗浄後、この蛋白質を、非直線勾配を有する100mLのDEAE洗浄緩衝液 (10mMトリス

、1.0mM K<sub>2</sub>EDTA、0.2mMジチオエリスリトル；pH7.2から10mMトリス、0.5M KC1、1.0mM K<sub>2</sub>EDTA、0.2mMジチオエリスリトル；pH7.2)でカラムから除する。カラムから溶出した画分を集め、280nmで蛋白容積について監視する。蛋白質を含む画分をブールし、前述の通り濃縮してPBSに対して一晩透析し、フォレート非含有物質を生成させる。

例8

(8 a) DHFRの抗体 (Z-L<sub>1</sub>-Recの形態)への結合

結合の方法論は、マレイミド基が抗体上にあるか、もしくはDHFR上にあるかに関係なく、かつスルフィドリル基を蛋白質に導入するために選択される方法に關係なく、本質的に同じである。結合の間の最終モル比は、等モルに近い抗体：DHFRに維持される。これは、結果として一方もしくは他方または両者の不活性化を招く蛋白質の過剝結合を制御するためである。以下の手順は、例7の物質への例6の物質の結果

結合に適用することができる。

還元に続いて(例7 aを参照)、試料であるDHFR (N)-CO-CH<sub>2</sub>-NSH (50ナノモル)を、例6 aに従って調製されるマレイミド-誘導体化ING-1 (5ナノモル)の溶液に、P D-10カラムから直接溶出させる。簡単に混合した後、Centricon-10 (登録商標)装置において、この溶液を遠心により約3.0mg/mL蛋白の濃度に急速に濃縮する。次いで、室温で4時間反応を進行させる。抗体-DHFR複合体をCentricon-30 (登録商標)濃縮機に移し、PBSで希釈する。遠心によって蛋白質を約500μLの容積に濃縮した後、PBSで再度希釈して3.0mLとし、再遠心する。保持された抗体-DHFRから非結合DHFRおよび他の低分子量生成物を分離するこの手順は、4回、もしくは溶液の280nmでの分光光度計モニタリングでさらなる蛋白質が通過されないことが示されるまで、繰り返す。最後に、Centricon-30 (登録商標)中の物質を溶液mL当たりING-1/DHFR約1.0mgに濃縮し、平衡化された2.6<sub>x</sub>60cm Sephacyr S-200サイズ排除カラムにかけ、150mM塩化ナトリウムを補足した50mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH7.2で溶出する。このカラムは抗体-DHFR複合体が

から非結合抗体を分離する。この複合体を含む溶液の画分をブールし、次いでCentricon-30装置において溶液mL当たりING-1/DHFR約1.0mgの濃度に濃縮する。この複合体を0.22μフィルターを通して無菌的に滤過し、使用時まで4℃で保存する。

この反応混合物に、I標識DHFRもしくは<sup>131</sup>I標識

ING-1のいずれかを添加することにより、結合の後の方に対する一方の蛋白質の比を算出することができる。

## (8 b) 抗体-マレイミドへの還元されたDHFRの結合 (スキーム1)

還元後、試料であるDHFR-SH (例7 c) (50ナノモル)を、例6 aに従って調製されるマレイミド-誘導体化ING-1 (5ナノモル)の溶液に、P D-10カラムから直接溶出した。簡単に混合した後、室温で4時間反応を進行させた。抗体-DHFR複合体をCentricon-30 (登録商標)濃縮器に移し、PBSで希釈し、遠心により約500μLの容積に濃縮した。次いで、この濃縮蛋白質をPBSで3.0mLの容積に希釈し、再遠心して500μLの容積にする。保持された抗体-DHFRおよび非結合DHFRおよび他の低分子量生成物を分離するこの手順を3回繰り返す。最後に、Centricon-30 (登録商標)中の物質を溶液mL当たりING-1/DHFR約1.0mgに濃縮し、平衡化された10<sub>x</sub>300mm Superose 12 FPLCサイズ排除カラムに適用して、150mM塩化ナトリウムを補足した50mMリン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.2)を用いて1mL/分の速度で溶出した。溶出液の光学密度を280nmで連続的に監視し、抗体-DHFR複合体を含む画分 (1.0mL)をブールした。ブールされた物質の蛋白質濃度をアッセイし、この複合体を使用時まで4℃で保存した。

システムBの例

システム B	
非放射性ダーベッ	放射性送達剤
ティング免疫試薬	
N R T I R	R D A
1 免疫反応性基 + (連結基 + リガンド) <sub>1</sub>	レセプター + (連結基 + キレート剤 + 放射性核種) <sub>1</sub>
2 Z-(L <sub>1</sub> -DHF R) <sub>1</sub> <sub>1</sub>	Rec-(L <sub>2</sub> -Q-N) <sub>1</sub>
3 Z-(L <sub>1</sub> -T M P) <sub>1</sub>	Rec-(L <sub>2</sub> -Q-N) <sub>1</sub>
4 Z-(L <sub>1</sub> -M T X) <sub>1</sub>	Rec-(L <sub>2</sub> -Q-N) <sub>1</sub>

ここで、

Zは免疫反応性基の残部；

R e cはレセプター、好ましくはDHF Rレセプターの残部；

Dは、レセプター、好ましくはDHF Rレセプターに非共有的に結合するための親和性を有するリガンドの残部；

DHF Rリガンドは、DHF R活性部位に非共有的に結合するための親和性を有するリガンドの残部；

T M Pはトリメト雷锋似体の残部；

M T Xはメトトレキセート類似体の残部；

L<sub>1</sub>およびL<sub>2</sub>は、各々独立に、別々に側鎖基を含み得る連結基の残部；

Qはキレート基の残部；

Mは放射性核種；並びに

nおよびmは、各々独立に、0よりも大きい整数である。

例9

(9 a) スルホ-S M C C (I N G-1-マレイミド) を有する抗体-マレイミドの調製

この生成物は例6 aの手順に従って調製する。

例10

(10 a) T M T (R e c-L<sub>1</sub>-Oの形態) へのD H F Rの結合  
ターピリジンメチレン四酢酸 (T M T) もしくはそれらの適当な誘導体を蛋白

(9 b) トリメトブリム-4'-O-酢酸システィンの調製

150m l の塩化メチレン中にL-Cys (COO-トリチル) を含有する臓臍 (30mM : Advanced Chem Tech) およびDCCを含む混合物に、100m l の塩化メチレン中に5-(4'-O-酢酸) (30mM) を含む溶液を少しづつ添加する。得られた反応混合物を2日間搅拌し、溶媒および尿素を除去してブロック化トリメトブリム-4'-O-酢酸システィンを得る。これは、トリフルオロ酢酸で穏やかに加水分解する際にトリメトブリム-4'-O-酢酸システィンを生成する。

(9 c) 抗体 (Z-L<sub>1</sub>-R e cの形態) へのトリメトブリム-4'-O-酢酸システィンの結合

例9 bに従って調製されるトリメトブリム-4'-O-酢酸システィン (50nMモル) を、例9 aに従って調製されるマレイミド-誘導体化I N G-1 (5nMモル) の溶液に直接添加する。簡単に搅拌した後、断続的に搅拌しながら、室温で4時間、反応を進行させる。抗体-トリメトブリム複合体をCentrificon-30 (登録商標) 濃縮器に移し、P B Sで希釈する。この蛋白質を遠心により約500 $\mu$  Lの容器に濃縮した後、再度P B Sで3.0m Lに希釈して再遠心する。保持された抗体-トリメトブリムおよび非結合抗体生成物から非結合トリメトブリムおよび他の低分子量生成物を分離するこの手順を4回繰り返す。最後に、Centrificon-30 (登録商標) 中の物質を溶液m l 当りI N G-1-トリメトブリム約10m gに濃縮し、平衡化された2.6×60cm Sephadryl S-200サイズ排除カラムに適用して、150m M塩化ナトリウムを補足した50m Mリン酸ナトリウム緩衝液、p H 7.2で溶出させた。このカラムは、抗体-トリメトブリム複合体から非結合抗体を分離する。この複合体を含む溶液の画分をプールし、次いで、Centrificon-30 (登録商標) 装置において遠心し、溶液m l 当りI N G-1-トリメトブリム約1.0m gの濃度にする。この複合体を、0.22 $\mu$  フィルターを通して無菌的に通過し、使用時までに4°Cで保存する。

質分子 (DHF R) に結合して、蛋白質-TMT複合体を生成させることができ。以下で参照されるDHF Rは、E.coliにおいて過剝発現するクローン化DHF R遺伝子由来の組換え生成物として產生される細菌由来のもの、もしくは組換え蛋白質として利用可能なヒト由来のものいづれかである。

DHF R (50ナノモル) を、酸洗浄した円錐状のガラス反応バイアルにおいて、TMT-イソチオシアネート (1.0M)

炭酸塩、150mM塩化ナトリウム緩衝液、pH9.3、中25ナノモル) と反応させる。この溶液を簡単に搅拌して反応体を混合し、室温で暗所に放置する。16時間後、この反応混合物を、予備洗浄され、150mM塩化ナトリウムを含有する50mM酢酸ナトリウム緩衝液、pH5.6で平衡化されたPD-10クロマトグラフィーカラムに適用することにより、DHF R/TMT複合体を非結合TMTから分離する。純粹な複合体を2.5mLの同じ緩衝液で溶出させ、Centricon-10 (登録商標) 濾縮装置を用いて濃縮する。

(10b) DHF R/TMTの<sup>32</sup>Yでの放射標識 (Rec-(L,-O-M).の形態)

1容積の放射活性化イットリウム (>500Ci/mg)の特定の活性を有する、0.04M塩酸中の90Y) を、2容積の0.5M酢酸ナトリウム、pH6.0を用いて中和する。中和した<sup>32</sup>Y (1.0mCi) を、150mM塩化ナトリウムを含む50mM酢酸ナトリウム、pH5.6、中にDHF R/TMT (1mg/mL) を含む溶液1.0mLに添加する。標識を1時間行なった後、この反応混合物を、予備洗浄され、150mM酢酸ナトリウムと共に50mMリソ酸ナトリウムを含む緩衝液、pH7.4 (PBS) で平衡化されたPD-10クロマトグラフィーカラムにかける。1.5mLのPBSを用いて試料をカラムから溶出させる。放射標識DHF R/TMTの画分 (0.5mL) を集め、放射活性についてアッセイし、ブールする。1.0 $\mu$ Lの試料を取り出し、それをGelman ITLC-SGストリップ上にスポットティングするごとに、標識効率を

ラスビーカーにおいて、溶媒の先端が紙の頂部までの3/4に達するまでの数分間展開する。このストリップを、<sup>32</sup>Yについて最適化され、かつコンパック [Co Ipaq] 386/20eコンピュータで制御されたSystem 200 Imaging Scanner (Biotech) に挿入する。このシステムでは、DHF R/TMT (<sup>32</sup>Y) が元の位置に止まるのに対して、遊離の<sup>32</sup>Yは溶媒先端に移動する。このシステムを用いることにより、全<sup>32</sup>Y放射活性の98%超が元の位置のDHF R/TMTに関連付けられることが見出される。

例11 システムAまたはシステムBから標識されたDHF R複合体についての試験

(11a) 蛋白濃度

複合体反応に用いるING-1およびDHF Rの濃度は、タンパク標準としてウシ免疫グロブリンを用いたバイオラッジタンパク試験 (Biokad protein assay) によって決定した。<sup>125</sup>Iでラベルした振舞量のDHF RまたはING-1を反応混合物中に含めることによって、また調製物の比活性を知ることによって、複合化後における一つのタンパクの他のタンパクに対する比率が計算される。

放射能でラベルする代わりに、DHF Rを他の材料、例えばTMG (<sup>32</sup>Yまたはヨーロピウム蛍光と共に使用)、ビオチン、フルオレセインシオシアネット (FITC) 等と結合して、溶液中に存在し又は他のタンパクに結合したDH

F Rの量を検出および定量することができる。

(11b) フローサイトメトリーによる免疫反応試験

抗体-DHF Rの複合体 (例えば例8) または抗体-トリメトプリム (例えば例10) を、ヒト腫瘍細胞系の表面に存在する抗原 (当該抗体を生じたもの) に結合する能力について試験する。この複合体の免疫反応性は、修飾を受ける前に、フローサイトメトリーによって抗体の標榜品と比較される。標的HT-29細胞 (アメリカン・タイプ・細胞庫コレクション: ATCCから得たヒト・アデノカルチノーマ細胞系) を、10%子牛血清を補充したマッコイ培地 (McCoy's media) を用いて、組織培養フラスコ内において集密状態にまで増殖させる。フ

ラスコ壁を細胞スクリーパーを用いて搔き集めることによって、細胞を回収する。

別々の多くのプラスコからの細胞をプールし、遠心してペレットにし、0.1%子牛血清アルブミン(シグマ社)および0.02%ナトリウムアシド(フローバッファー社)を補充した、pH7.4の150mM塩化ナトリウム緩衝液(PBS)を含む水冷50mMリン酸ナトリウム緩衝液中に、 $5 \times 10^6$ /mLで再懸濁する。細胞をこの同じ緩衝液で洗浄し計数する。各サンプルが1mL当たり1.0mLのタンパクを含有するように、フロー緩衝液中で抗体標準曲線を作成する。ついで、標準曲線からのサンプルおよび未知のING-1-DHFR、または未知のING-1-トリメトアリムを、 $5 \times 10^6$ 個のHT29細胞と共に、4°Cで1時間インキュベートする。広範囲に洗浄して未結合の抗体を除去した後、細胞を100 $\mu$ Lのフロー緩衝液中に再懸濁し、

フルオレセインシンチオシアネートでラベルされたヒツジ抗ヒト抗体と共に、4°Cで1時間インキュベートする。フロー緩衝液中で更に洗浄した後、クーラータEPICS 750フローサイトメータでのフローサイトメトリーによってサンプルを分析する。フルオレセインシンチオシアネート(FITC)およびヨウ化プロピジウム(Pi)を、アルゴンレーザの488nm発光線を用いて励起させる。出力は光調節モードにおいて500mWにセットする。単一細胞は、前方に向かって角度90°の光散乱器によって同定する。これらラバーメータに分析窓を適用して、集合体および細胞塊から單一細胞を分離する。FITCおよびプロピジウムからの蛍光を路長550nmの二色フィルターを用いて分離し、530nmのバンドパスフィルター(FITCについて)および635nmのバンドパスフィルター(Piについて)を通して回収する。光散乱パラメータは集積されたパルスとして集められまた蛍光は10 $\mu$ g集積されたパルスとして集められる。Pi吸込みについて陰性の細胞上に分析窓を置くことによって、死細胞を分析から排除する。それらのヒストグラムについて、細胞当たりの平均蛍光(2500個の細胞からの重量平均)を計算する。各実験においてFITC検量ビーズ(calibration beads)を分析して、蛍光標準曲線を確立する。次いで、平均蛍光強度を、1細胞当たりの平均FITC当量として表す。免疫反応性は、ING-1-DHFRサンプルまたはING-1-トリメトアリムサンプルの平均強度を、標準曲線からの値と比較する

ことによって計算される。

(11c) ELISAによる免疫活性試験

細胞スクレーバで培養プラスコの壁から集密状態の細胞単層を掻き出すことによって、L9174T細胞またはHT-29細胞(ATCCから入手可能)から、抗体のING-1が結合する抗原を調製する。多くのプラスコからの細胞を一つに合体させ、サンプルを採取して計数し、回収した細胞の全数を評価する。細胞は常に水上に維持する。細胞を4°Cにおいて10分間、1500rpmで遠心した後、150mMの塩化ナトリウム(PBS)を補充した水冷50mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.4)中で細胞を1回洗浄し、同じ条件でペレット化し、10mL PBS中で水冷ガラスモルタルへ移す。モータ駆動の乳棒を用いて4°Cで細胞をホモジニアイズし、次いで3,000 $\times$ gで5分間遠心する。抗原に富む上清を他の細胞断片から除去し、更に、4°Cにおいて100,000 $\times$ gで1時間の遠心を行う。細胞百万個毎に、この最終工程で得たペレット(抗原画分)を100 $\mu$ LのPBS中に懸濁させる。タンパク濃度を評価した後(タンパク標準としてウシ免疫グロブリンを用いたバイオラッドBCAタンパク試験)、使用時まで抗原を-20°Cで貯蔵する。

96穴コースターマイクロタイバーブレート(96-well Costar microtiter plate)の各ウエルに、上記で調製した細胞溶解液(10mg/mL)をウェル当たり100 $\mu$ L添加することによって抗原をコートする。37°Cのインキュベータ中で、このマイクロタイバーブレートを一晩乾燥させる。ブレートを0.05%のTween-20で5回洗浄した後、プロットして乾燥し

た。ウェル当たり125 $\mu$ LのPBS中1%BSA(ウシ血清アルブミン、シグマ社)溶液を添加し、室温で1時間インキュベートすることにより、各ブレートのウェルをプロッキング処理した。このブレートを、0.05%のTween-20で5回洗浄した。ING-DHFRまたはING-1トリメトアリム複合体および標準ING-1抗体溶液のサンプル(50 $\mu$ g/ウェルを二つ)を、PBS中の1%BSAでの濃度範囲で調製する。ビオチニル化ING-1(0.1%BSA中で1.0mg/mL)を各ウエルに添加し、次いで室温で2時間、ブレートをインキュベートした。0.05

9%のTween-20で5回洗浄した後、プレートをプロット乾燥し、希釈 (0.1% B S A中で1:2000) したストレプトアビジンーアルカリホスファターーゼ (Tago社) と共に、室温において1時間インキエベートする。更に5回洗浄した後、ウェル当たり  $100\mu\text{L}$  のホスファターゼ基質剤 (シグマ社) を添加すると、夫々のウェルにおいて発色が生じる。室温で1時間後に、タイターテック・マルチスキャナ・マイクロプレート・リーダー (Titertek Multiscan microplate reader) 中において、 $405\text{nm}$  フィルターを用いて色を読み取る。

(11d) SDS・PAGE電気泳動

ING-1-DHFR複合体またはING-1-トリメトブリム複合体のサンプルを、SDS緩衝液を用いて、ノベックス (Novex) 8%～16%還元ポリアクリルアミドゲルおよび本来のボリアクリリアミドゲル上での電気泳動にかけ、その見掛けの分子量および調製の均一度を評価する。同じゲル上での

既知分子量の電気泳動による標準を用いて、移動距離vs分子量対数の標準曲線を作成する。この標準曲線から、個々の複合体プレレーションに関連したバンドの相対分子量を決定する。

(11e) サイス排除HPLCによる凝集形成の測定

同じ材料のガードカラムを設けた30cm  $\times$  7.5mmのTSK-G3000SWサイズ排除HPLCカラム (Sugilite社) を、400-600PSIでの流速が $1.0\text{mL}/\text{分}$ のオーターズ600E HPLCシステムを用いて、 $150\text{mM}$ 塩化ナトリウムを補充した $1.2\text{mL}$ カラム容量の $10\text{mM}$ リン酸ナトリウム緩衝液 ( $\text{pH}6.0$ ) で平衡化する。Bio Radゲル遮退タンパク標準の試料 ( $25\mu\text{L}$ ) をカラム上に注入する。Waters 490 UV検出器セットによって、 $280\text{nm}$ で各標準の保持時間をモニターする。最後の標準を回収した後、カラムを、 $150\text{mM}$ 塩化ナトリウムを補充した $10\text{mL}$ の $10\text{mM}$ リン酸ナトリウム緩衝液 ( $\text{pH}6.0$ ) で洗浄する。本来のING-1-トリメトブリム複合体のサンプル ( $30\mu\text{L}$ ) を、 $200\mu\text{L}/\text{mL}$ でカラム上に注入し、それらの保持時間を記録する。保持ピークの面積および保持時間から、サンプリングしたING-1-DHFR複合体またはING-1-トリメトブリム複合体における凝集物の量を計算する。

(11f) DHFR活性の測定

下記の事項をモニターするために、特にDHFRの酵素活性を用いる：

i) 抗原に対する抗体の結合測定に類似した仕方での酵素

活性の保存；複合化の作用が酵素を阻害しないことを確かめるために、複合化の前後の酵素活性が試験される；

ii) 逆離DHFRおよび抗体に結合したDHFRに対する、薬剤 (例えば、上記例1～5に記載したトリメトブリムおよびトリメトブリム類似体) の阻害効果；

iii) トリメトブリムに基づくTMT [ $^{10}\text{Y}$ ] デリバリー系の効果を試験する；

iv) 溶液中のDHFR量の測定。

シグマケミカルカンパニーの1992カタログ350頁に従えば、DHFR活性は単位で規定されている；前記DHFR酵素活性の1単位は、 $1.0\text{マイクロモル}$ の $7.8\text{-ジヒドロ葉酸}$ および還元形の $\beta$ -ニコチンアミドアデニジヌクレオチドリシン酸 (NADPH) を、 $\text{pH}6.5$ および $25^\circ\text{C}$ で一分間に、 $5.6.7.8$ -テトラヒドロ葉酸および酸化形の $\beta$ -ニコチンアミドアデニジヌクレオチドリシン酸 (NADP) に変換するに必要な量として定義されている。

酵素の活性は、ジヒドロ葉酸のテトラヒドロ葉酸への還元の際にNADHがNADに酸化される速度に従って、 $340\text{nm}$ において分光的に測定された。酵素基質 ( $7.8\text{-ジヒドロ葉酸}$  ( $5.44\text{mM}$ )) の新鮮な解凍溶液の一部 ( $362\mu\text{L}$ ) を、 $38\mu\text{L}$ の $\beta$ -メルカプトエタノールおよび $600\mu\text{L}$ の $100\text{mM}$ ミダゾール緩衝液 ( $\text{pH}7.0$ ) で処理した。DHFRの酵素活性を測定するため、この反応混合物には、 $20\mu\text{L}$  ( $3.2\text{mg}/\text{mL}$ ) のNADPH、 $20\mu\text{L}$ の上記 $7.8$ -ジヒドロ葉酸混合物および $935\mu\text{L}$ の $100\text{mM}$ ミダゾール緩衝液 ( $\text{pH}7.0$ ) を含ませた。DHFRのサンプル ( $5\mu\text{L}$  ;  $120\text{ng}$ のタンパク) を予め $25^\circ\text{C}$ で解凍しておいた反応混合物に添加し、迅速に混合し、 $340\text{nm}$ での光学密度の変化を、シマズ社の160U紫外線分光光度計で5秒毎に合計120秒間モ

ニターした。光学密度vs時間のプロットの傾斜から活性(単位/mL)を算出した。

(11g) DHFR活性の阻害

トリメトブリム(TMP)、又はH-N-[D-Gly]-Ala-Ala-Ala-Lys-Lys-OH

(例3)のTMPペプチド)のトリメトブリム-4'-O-酢酸アミドを、濃度領域において、DHFRまたはING-1-DHFR複合体のサンプルと共に、2時間予備インキュベートした。次いで、先に述べたようにして(例11f)、DHFRの活性を試験し、酵素活性の50%阻害(1C<sub>50</sub>)を生じるために必要なTMPまたはTMPペプチドの濃度を算出した。

阻害剤	DHFR単独の 1C <sub>50</sub> 濃度	ING-1/DHFR複合体 の1C <sub>50</sub> 濃度
TMP	< 1.0 nMol	1.0 nMol
TMP-ペプチド	4.2 nMol	1.0 nMol

(11h) ING-1-DHFR複合体中のDHFRの定量

酵素活性の試験(例11f)におけるDHFRの代わりに、ING-1/DHFR複合体(例8bから)のサンプル(1.2μgのタンパク)を用いた。この複合体の活性(単位/mL)は、先に述べたように、光学密度vs時間のプロッ

トの傾斜から算出した。例8bにおいて調製された複合体の活性および公知の標準量の非複合DHFRの活性から、夫々の抗体分子に結合したDHFRの平均分子数を計算したところ、抗体1分子当たりのDHFR分子の数は0.34であることが分かった。

特に好ましい実施例を参照して本発明を詳細に説明したが、本発明の精神および実施範囲において、種々の変形および改良を行ない得ることが理解されるであろう。

[国際調査報告]

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l. Search application No.  
PCT/US93/11442

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC: A61K 36/00, 43/00, 50/353  
US CL: 435/6, 7.1, 7.2, 7.3, 7.5, 26, 42/61.1, 9, 13.4  
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

U.S. : 435/6, 7.1, 7.2, 7.3, 7.5, 26, 42/61.1, 9, 13.4

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Please See Entry Sheet.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passage	Relevant to claim No.
X P	Cancer Research, Volume 53, issued 15 May 1993, G.A. Hawkins et al, "Delivery of Radiouracilides to Prebiogated Monoclonal Antibodies Using Dihydrofolate Reductase and Methotrexate in an Affinity system", pages 2368-2373, especially the Abstract.	1-54
X	Journal of Nuclear Medicine, Volume 28, No. 8, issued 1-5, 12, 13, 19, August 1987, D.J. Hnatowich et al, "Investigation of Avidin and Biotin for Imaging Applications", pages 1294-1302, especially the Abstract; the lower right-hand column of page 1295, and the upper left-hand column of page 1296.	20, 23, 24, 52
Y		6, 10, 11, 17, 18, 21, 22, 25, 30, 32-35, 41, 51, 53

Further documents are listed in the continuation of Box C.  See patent family sheet.

Several categories of cited documents:

General categories of cited documents:

'A' documents concerning the field of the invention and considered to be of potential relevance;

'B' other documents related to a different field of technology, but considered to be of interest in evaluating the claims in view of the technique used in the invention;

'C' documents concerning the patent or application itself and the legal status thereof;

'D' documents concerning the same area as the present application and also concerning the patent or application itself;

'E' documents referring to or citing the patent or application or other documents;

'F' documents which have been cited by another document referred to in the present application;

'G' the priority document;

Date of the actual completion of the international search

50 MARCH 1994

APR 06 1994  
Date of mailing of the international search report

Name and mailing address of the ISA/OIS Commissioner of Patents and Trademarks Washington, D.C. 20591 Telephone No. (703) 305-3210	Authorized officer Tom R. Schaefer Telephone No. (703) 305-0196
---	---

Form PCT/ISA/210 (second edition/July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l. application No.  
PCT/US93/11842

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Classification, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Journal of Controlled Release, Volume 11, No. 1-3, issued 1989, Y.P. Torchilin et al., "Antibody-Linked Chelating Polymers for Immunoimaging In Vivo", pages 297-303, especially the Abstract.	1-5, 12, 13, 19, 20, 23, 24, 52 6, 10, 11, 17, 18, 21, 22, 23-30, 32-35, 41-51, 53
—		
Y		
X	Cancer Research, Volume 51, issued 01 November 1991, G. Paganini et al. "Three-Step Monoclonal Antibody Tumor Targeting in Carcinoembryonic Antigen-positive Patients", pages 5960-5966, especially the Abstract.	1-5, 12, 13, 19, 20, 23, 24, 52 6, 10, 11, 17, 18, 21, 22, 23-30, 32-35, 41-51, 53
—		
Y		

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l. application No.  
PCT/US93/11842

## B. FIELDS SEARCHED

Electronic data bases consulted (Name of data base and where predictable terms used):

DIALOG: Medline, CAB Abstracts, Nucleic Acids, Computer, Document: Automated Patent System  
SEARCH TERMS: imaging, target, monoclonal, precursor, anti, label, ibuprofen, indomethacin, analgesic, enkephalin, receptor, vivo, two step, three step, immunoscan, immunoassay, stow R. A., Kruer L. I., Black C D V, Sherman C W

## プロントページの焼き

(51)Int.Cl.\*      識別記号      執内整理番号      FI

(C 1 2 N      1/21)  
 C 1 2 R      1:19)

C 1 2 N      9/06      Z      9359-4B

(72)発明者 クルーズ、ローレンス・アイ  
 アメリカ合衆国、ニュージャージー州  
 08033、ハドンフィールド、クリントン・  
 アベニューアベニューアベニュー 646

(72)発明者 ブラック、クリストファー・デー・ブイ  
 アメリカ合衆国、メリーランド州 20906、  
 シルバー・スプリング、アカエイアス、  
 アベニューアベニューアベニュー 2815

(72)発明者 シャーマン、クライド・ダブリュ  
 アメリカ合衆国、ベンシルバニア州  
 1938、ウエスト・チェスター、チエスター  
 ビル・ウェイ 607